Untersuchungen zum Transport von Antibiotika über die Aufnahmesysteme für Oligopeptide und Sideramine

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

HEYKE DIDDENS

aus

Bunderhammrich

1979

Untersuchungen zum Transport von Antibiotika über die Aufnahmesysteme für Oligopeptide und Sideramine

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

HEYKE DIDDENS

aus

Bunderhammrich

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 24. April 1979
Dekan: Professor Dr. F. Oberwinkler
1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Zähner
2. Berichterstatter: Professor Dr. V. Braun

Gesamtherstellung: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Meinen Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536519_0060

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Professor Dr. H. Zähner am Institut für Biologie II, Lehrbereich Mikrobiologie I der Universität Tübingen durchgeführt.

Für die Überlassung des Themas, die vielen wertvollen Ratschläge und Anregungen und die stetige Förderung danke ich Herrn Professor Dr. H. Zähner herzlich.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppen von Professor Dr. W. Keller-Schierlein, ETH Zürich, und Professor Dr. G. Jung, Universität Tübingen, danke ich für die Synthese semisynthetischer Sideromycine und toxischer Tripeptide.

Herrn Dr. J.V. Höltje möchte ich für die zahlreichen anregenden Diskussionen recht herzlich danken.

Herrn K. Wunsch danke ich für seine Hilfe bei der Anfertigung der Abbildungen.

Allen Mitarbeitern der Lehrbereich Mikrobiologie I und II danke ich für die gute Zusammenarbeit.

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Abkürzungen verwendet:

ATCC	American Type Culture Collection, Rockville, Md., U.S.A.
CBC	Central Bureau voor Schimmelcultures, Baarn Niederlande
ETH	Stammsammlung des Instituts für spezielle Botanik der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich, Schweiz
NCTC	National Collection of Type Culture, London, U.K.
TÜ	Stammsammlung des Instituts für Mikrobiologie I der Universität Tübingen
TÜ,EMS	Stammsammlung Dr. E.M. Sander, Institut für Biologie II der Universität Tübingen
TÜ,MII	Stammsammlung des Instituts für Mikrobiologie II der Universität Tübingen
DPT	Dipeptid-Transport
OPT	Oligopeptid-Transport
MHK	minimale Hemmkonzentration
MSO	Methioninsulfon
MSO-$(Ala)_2$	L-Methioninsulfonyl-alanyl-alanin
PMS-$(Ala)_2$	L-(N^5-Phosphono)methionin-S-sulfoximinyl-alanyl-alanin
PTC-$(Ala)_2$	L-Phosphinothricyl-alanyl-alanin

Für die Aminosäuren wurden die geläufigen Standardabkürzungen verwendet.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
1.	E I N L E I T U N G	1
2.	M A T E R I A L U N D M E T H O D E N	19
2.1.	CHEMIKALIEN	19
2.1.1.	Chemikalien für Nährmedien; Peptide	19
2.1.2.	Antibiotika	20
2.1.3.	Sideramin-Derivate	21
2.2.	NÄHRMEDIEN	21
2.3.	MIKROORGANISMEN	23
2.3.1.	Bakterien	23
2.3.2.	Pilze	24
2.3.3.	Phagen	25
2.4.	BIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGSMETHODEN	25
2.4.1.	Isolierung des Rohprodukts von L-Phosphinothricyl-alanyl-alanin	25
2.4.2.	Plattendiffusionstest	25
2.4.3.	Kreuztest	26
2.4.4.	Verdünnungsreihentest	26
2.4.5.	Biophotometerversuche	27
2.4.6.	Isolierung L-Phosphinothricyl-alanyl-alanin-resistenter Mutanten von Escherichia coli K-12	27
2.4.7.	Phagenversuche	28
2.4.8.	Isolierung L-Phosphinothricyl-alanyl-alanin-resistenter Mutanten von Bacillus subtilis	28
2.4.9.	Isolierung Albomycin-resistenter Mutanten von Staphylococcus aureus 2070Z	28

Seite

3. E R G E B N I S S E 29

3.1. TRANSPORT VON ANTIBIOTIKA ÜBER DAS OLIGOPEPTID-TRANSPORTSYSTEM VON ESCHERICHIA COLI K-12 29

3.1.1. Transport der Tripeptid-Antibiotika L-Phosphinothricyl-alanyl-alanin, L-(N^5-Phosphono)methionin-S-sulfoximinyl-alanyl-alanin und Plumbemycin B 29

3.1.1.1. Kompetitionsversuche mit Peptiden 29

3.1.1.2. Isolierung und Charakterisierung L-Phosphinothricyl-alanyl-alanin-resistenter Mutanten von Escherichia coli K-12 38

3.1.2. Aufnahme eines Antibiotika-Spektrums 40

3.2. VERBREITUNG VON PEPTID-TRANSPORTSYSTEMEN BEI VERSCHIEDENEN MIKROORGANISMEN 42

3.2.1. Transport von L-Phosphinothricyl-alanyl-alanin 42

3.2.2. Transport weiterer Peptid-Antibiotika 48

3.2.2.1. Fumarylcarboxyamido-L-2,3-diaminopropionyl-L-alanin 48

3.2.2.2. Polyoxin, Nikkomycin 49

3.3. TRANSPORT VON METHIONINSULFON UND L-METHIONINSULFONYL-ALANYL-ALANIN 50

3.3.1. Kompetitionsversuche 50

3.3.2. Untersuchungen an L-Phosphinothricyl-alanyl-alanin-resistenten Mutanten 52

3.3.3. Vergleich der minimalen Hemmkonzentrationen 52

3.3.4. Kombinationsversuche mit Methioninsulfon und L-Methioninsulfonyl-alanyl-alanin 54

3.4. UNTERSUCHUNG SEMISYNTHETISCHER SIDEROMYCINE 58

3.4.1. Bestimmung antibakterieller Aktivität 59

3.4.2. Kompetitionsversuche 61

3.4.3. Isolierung und Charakterisierung Albomycin-resistenter Mutanten von Staphylococcus aureus 64

3.4.4. Vergleich der minimalen Hemmkonzentrationen 64

Seite

4. D I S K U S S I O N 65

5. Z U S A M M E N F A S S U N G 79

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S 81

1. E I N L E I T U N G

Seit der Entdeckung des Penicillins wurden über 4000 Antibiotika isoliert (BERDY, 1974). Nur 1% dieser Hemmstoffe sind jedoch für eine Anwendung in Human- und Veterinärmedizin oder im Pflanzenschutz geeignet, da geringe Wirksamkeit, Instabilität, Toxizität, rasche Resistenzentwicklung und ein unbefriedigendes Wirkungsspektrum einem praktischen Einsatz der meisten Antibiotika entgegenstehen.

Der Bedarf an brauchbaren Antibiotika ist noch lange nicht erschöpft. Eine dringende Nachfrage nach neuen Hemmstoffen besteht auf medizinischem Gebiet unter anderem weiterhin gegen Gram-negative Bakterien und systemische Mycosen erzeugende Pilze, und im Bereich des Pflanzenschutzes gegen phytopathogene Bakterien und Pilze sowie Nematoden (ZÄHNER, 1977). Da die bisher angewandten klassischen Screening-Methoden (ZÄHNER, 1965) heute immer seltener zur Entdeckung unbekannter antibiotischer Substanzen führen, müssen spezifische Testmodelle entwickelt werden. Bei den herkömmlichen Methoden wurde die Frage der Eindringung der Wirkstoffe in die abzutötende Zelle vernachlässigt. Es ist daher zu vermuten, daß zahlreiche medizinisch und theoretisch interessante Hemmstoffe nicht gefunden wurden, weil sie auf Grund von Permeationsschwierigkeiten nicht in ausreichenden Konzentrationen an ihren Wirkort im Testkeim gelangen. Möglichkeiten für neue Screening-Methoden bestehen z.B. in der Verwendung extrem empfindlicher oder stark permeationsgeschädigter Testkeime oder in der Anwendung von zellfreien Testsystemen. So gefundene Hemmstoffe könnten möglicher-

weise durch chemische Modifikation für eine Anwendung nutzbar gemacht werden.

Es gibt Beispiele, daß Wirkorte in zellfreien Systemen, isoliert aus verschiedenen Bakterienstämmen, die gleiche Sensitivität gegen ein Antibiotikum aufweisen, während die intakten Zellen sehr unterschiedliche Empfindlichkeiten zeigen (ZIMMERMANN, 1970; FRANKLIN, 1973; DENGLER, 1979).
Die Resistenz gegen bestimmte Substanzen kann daher als Unterschied in der Permeationsbarriere bei verschiedenen Organismen angesehen werden. Erworbene Resistenz auf Grund von Mutation oder durch Transfer genetischer Information von anderen Zellen kann ebenso - neben anderen Resistenzmechanismen (ZÄHNER, 1965) - durch Veränderung der Permeabilität der Zellwand bedingt sein. Als Beispiele hierfür kann man die Resistenz gegen Tetracyclin (FRANKLIN, 1967; LEVY und McMURRAY, 1974), Sideramine (KNÜSEL und ZIMMERMANN, 1975; BRAUN et al., 1976), Bacilysin (KENIG und ABRAHAM, 1976; KENIG et al., 1976), D-Cycloserin (WARGEL et al., 1971) und Isoniazid (SRIPRAKASH und RAMAKRISHNAN, 1970) anführen.

Die Möglichkeit der Substanzen, durch Akkumulation am Wirkort eine ausreichend hohe Konzentration zu erreichen, ist eine notwendige Voraussetzung für die Effektivität und das antimikrobielle Spektrum aller Antibiotika, die einen intrazellulären Wirkort haben. Die erzielte Konzentration hängt hauptsächlich von der Aufnahmerate der Substanz durch die verschiedenen Permeationsbarrieren der Zellwand ab (FRANKLIN, 1974).

Es gibt eine Vielzahl von Antibiotika mit den verschiedensten chemischen Strukturen, die selbst in extrem geringen Konzentrationen im Außenmedium antibakteriell wirksam sind. Dies legt den Gedanken

nahe, daß sie im Zellinnern akkumuliert werden. In Einzelfällen wurde eine Anreicherung gegen ein Konzentrationsgefälle beschrieben (ZIMMERMANN und KNÜSEL, 1969; FRANKLIN, 1974). Eine solche intrazelluläre Anreicherung kann im allgemeinen durch einfache Diffusion nicht mehr erklärt werden. Eine Differenzierung zwischen passiver Diffusion, erleichterter Diffusion und aktivem Transport kann sehr schwierig sein. Spezifische Bindungsstellen im Bereich des Wirkortes der Zelle können nämlich eine intrazelluläre Anreicherung des Hemmstoffes bewirken, auch wenn Carrier-vermittelte, erleichterte Diffusion oder sogar nur passive Diffusion vorliegt, und täuschen so einen aktiven Transport vor (BRAUN, 1977).

Antibiotika sind zum Teil Moleküle mit Molekulargewichten weit über 1000 (Vancomycin hat ein Molekulargewicht von 3300 (JORDAN und REYNOLDS, 1967)) und oft sehr bizarrem Aufbau (z.B. Bleomycin (UMEZAWA, 1975)). Es liegt daher die Frage nahe, welche Transport-Systeme sie benutzen. Da unwahrscheinlich ist, daß Bakterien im Lauf der Evolution spezielle Transportsysteme für Antibiotika entwickelt haben, ist zu vermuten, daß bestehende Transportsysteme für natürliche Substrate von den Antibiotika verwendet werden können. Solche Transportsysteme müssen relativ unspezifisch sein, und die Antibiotika müssen den strukturellen Anforderungen der Transportsysteme entsprechen. Für eine Reihe von Antibiotika, die Strukturanalogie zu Nährstoffen aufweisen, wurde ein aktiver Transport in die Zelle über die entsprechenden Transportsysteme beschrieben (Tab.1).

Tab. 1: Bekannte Transportsysteme für Antibiotika

Antibiotika	Natürliche Substrate der Transportsysteme	Literatur
Azaserin	aromatische Aminosäuren	AMES und ROTH, 1968
D-Cycloserin	D-Alanin	WARGEL et al., 1970, 1971
Bacilysin	Dipeptide	KENIG und ABRAHAM, 1976; KENIG et al.,1976
Showdomycin	Desoxycytidin	KOMATSU und TANAKA, 1972
Fosfomycin	α-Glycerophosphat	KAHAN et al., 1974
	Hexose-6-Phosphate	WU und VENKATESWARAN, 1974
Tetracyclin	Oxalacetat	PLAKUNOV, 1973
Nojirimycin	Glucose	SCHINDLER, 1976
Streptozotozin	N-Acetyl-D-Glucosamin	BRENNENSTUHL, 1976
Streptomycin	Polyamine	HÖLTJE, 1978, 1979 a
Albomycin	Sideramine	KNÜSEL und ZIMMERMANN, 1975 HANTKE und BRAUN, 1975 a
A 22765	Sideramine	ZIMMERMANN und KNÜSEL, 1969

Für die Akkumulation von Chloramphenicol wurde ebenfalls eine Energieabhängigkeit beschrieben (VAZQUES, 1963, 1964), man weiß jedoch nichts über das an der Aufnahme beteiligte Transportsystem.

Das Konzept der vorliegenden Arbeit ist, Hemmstoffen die Aufnahme über bestehende Transportsysteme zu ermöglichen, indem die Stoffe entweder chemisch derart modifiziert werden, daß sie den strukturellen Anforderungen eines Transportsystems entsprechen, oder sie an Vehikel gebunden werden, für die Transportsysteme vorhanden sind. Dieses Konzept soll an zwei Beispielen, dem Oligo-Peptid-Transportsystem (OPT-System) und dem Sideramin-Transportsystem erprobt werden.

Peptid-Transport

Bei der Untersuchung der Wirkungsweise eines Glutamin-Antagonisten, des Tripeptid-Antibiotikums L-Phosphinothricyl-alanyl-alanin (PTC-$(Ala)_2$) (Abb.2, I) (GUGEL, 1971) wurde beobachtet, daß das Antibiotikum eine starke Hemmwirkung auf intakte Zellen von Escherichia coli und Bacillus subtilis ausübt. Phosphinothricin (PTC) allein ist dagegen in vivo praktisch unwirksam. Im zellfreien System zeigt dagegen das Tripeptid keine Aktivität, während die phosphorhaltige Aminosäure die Glutaminsynthetase aus Escherichia coli hemmt (GUGEL, 1971). Die Ergebnisse aus den in vivo Versuchen im Vergleich zu der Wirksamkeit von PTC und PTC-$(Ala)_2$ in vitro lassen darauf schließen, daß die Tripeptidform die Aufnahme des Antibiotikums in die Zelle begünstigt, und daß zur Ausprägung der Wirksamkeit das PTC in der Zelle von dem Alanyl-alanin Rest abgespalten werden muß (BAYER et al., 1972). Der Alanyl-alanin Rest kann also als Vehikel für die Aufnahme des PTC angesehen werden. Ein ähnlicher Transport-Effekt könnte die größere

antibakterielle Aktivität des Tripeptid-Antibiotikums L-(N^5-Phosphono)methionin-S-sulfoximinyl-alanyl-alanin (PMS-$(Ala)_2$) (Abb.2, II) (PRUESS et al., 1973) im Gegensatz zur freien Aminosäure (N^5-Phosphono)methionin-S-sulfoximin erklären. Dieses Antibiotikum ist ebenfalls ein Hemmstoff des Glutaminsynthetase und weist Strukturverwandtschaft mit PTC-$(Ala)_2$ auf.

Als geeignetes Transportsystem bietet sich für diese Antibiotika das von GILVARG (1972), PAYNE (1976) und PAYNE und BELL (1979) eingehend untersuchte OPT-System an. Auf Grund der relativ geringen Anforderungen dieses Transportsystems an die molekularen Strukturen der Peptide (Abb.1) können Peptide unterschiedlichster Struktur in die Bakterienzelle transportiert werden. Das Tripeptid-Antibiotikum Plumbemycin B (Abb.2, III) (PARK et al., 1977 a,b,), ein Threonin-Antagonist, erfüllt ebenfalls die Strukturanforderungen des Transportsystems. Ein Vergleich der Strukturspezifität des OPT-Systems (Abb.1) mit den Strukturen der oben beschriebenen Tripeptid-Antibiotika (Abb.2) läßt einen Transport der Antibiotika über dieses System vermuten.

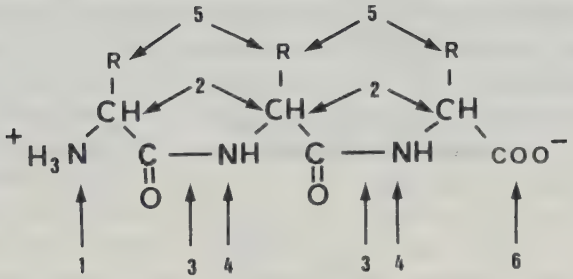


Abb. 1 Zusammenfassung der wichtigsten strukturellen Anforderungen des Oligopeptid-Transportsystems bei Escherichia coli (PAYNE, 1975, 1976).

1 : Die α-Aminogruppe kann monosubstituiert sein, die positive Ladung muß jedoch erhalten bleiben.

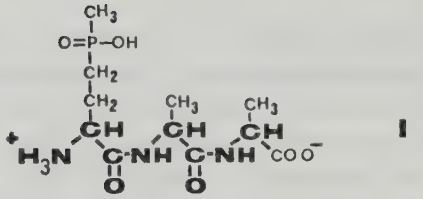
2 : Es besteht eine Stereospezifität für L-Aminosäuren.

3 : Die α-Peptidbindungen sind essentiell.

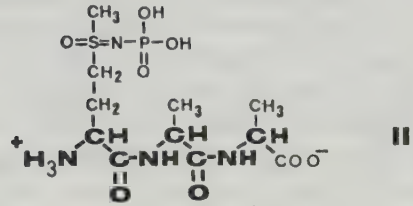
4 : Der Stickstoff kann methyliert sein.

5 : Die Natur der Seitenketten ist unwichtig, möglich sind: natürliche oder substituierte Reste, synthetische Analoge.

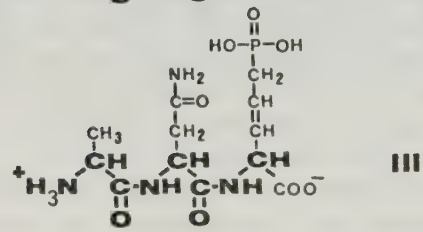
6 : Die C-terminale α-Carboxylgruppe kann substituiert sein oder ganz fehlen. Die Größe des Oligopeptids ist ein begrenzender Faktor für die Aufnahme.



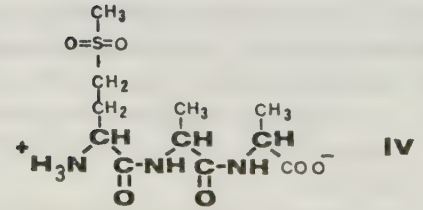
I



II



III



IV

Abb. 2: Strukturen der untersuchten Tripeptide.

I : L-Phosphinothricyl-alanyl-alanin

II : L-(N^5-Phosphono)methionin-S-sulfoxyminyl-alanyl-alanin

III: Plumbemycin B

IV : L-Methioninsulfonyl-alanyl-alanin

Die den strukturellen Anforderungen des OPT-Systems entsprechenden Peptidsequenzen sind hervorgehoben.

Die meisten Transportsysteme weisen eine erhebliche Strukturspezifität auf. Dies trifft jedoch nicht für das OPT-System zu. Das OPT-System ist von Transportmechanismen für Aminosäuren und Dipeptiden zu unterscheiden (PAYNE, 1968). Durch die genaue Kenntnis der strukturellen Anforderungen für den Peptid-Transport in Bakterien (PAYNE und GILVARG, 1971, 1978; MATTHEWS und PAYNE, 1975 a, b) ergibt sich die Möglichkeit, auf Grund der fehlenden Spezifität in Bezug auf die Aminosäure-Seitenketten und die C-terminale Carboxylgruppe bestimmte Moleküle an die Seitenketten oder an das Carboxylende zu binden und sie auf diese Weise in die Zelle zu transportieren. Für Substanzen, die sonst nicht in die Zelle aufgenommen werden, lassen sich mit dieser Technik bakterielle Permeationsbarrieren überwinden.

Dieses Prinzip wurde schon in verschiedenen Arbeitsgruppen demonstriert. FICKEL und GILVARG (1973) untersuchten die Aufnahme der Threonin-Vorstufe Homoserin-Phosphat in die Threonin-auxothrophe Mutante Escherichia coli WTL3. Homoserin-Phosphat wird in der freien Form nicht transportiert. Nach Verknüpfung an das Carboxylende von Lysyl-lysin wird es in die Zelle aufgenommen und zeigt nach der Spaltung einen nutritiven Effekt.

AMES et al. (1973) zeigten den Transport von Histidinol-Phosphatester, ein Zwischenprodukt der Histidin-Biosynthese, in Form des Peptides Glycyl-glycyl-histidinol-phosphat bei einer Histidin-auxothrophen Mutante von Salmonella typhimurium. Freier Histidinolphosphatester wird von Salmonella typhimurium nicht aufgenommen. Diese Autoren stellten ebenfalls fest, daß verschiedene Aminosäure-Analoge in der Form ihrer Tripeptid-Derivate eine erhöhte Wirksamkeit gegen Salmonella typhimurium aufwiesen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde den Strukturanforderungen des OPT-Systems entsprechend der Hemmstoff der Glutaminsynthetase, Methioninsulfon (MSO) an einen Alanyl-alanin Rest gebunden (Abb. 2, IV). In der vorliegenden Arbeit wird zunächst untersucht, ob die in Abbildung 2 aufgeführten Tripeptid-Antibiotika über das OPT-System aufgenommen werden. Ebenso soll geklärt werden, ob das synthetische Tripeptid L-Methioninsulfonyl-alanyl-alanin (MSO-$(Ala)_2$) über das OPT-System transportiert wird. Die Verbreitung dieses Tansportsystems bei verschiedenen Mikroorganismen soll unter spezieller Berücksichtigung phytopathogener Keime untersucht werden. Weiterhin wird die Hypothese geprüft, daß die simultane Gabe eines Hemmstoffes und seines Derivates, die über zwei verschiedene Wege in die Zelle transportiert werden, im Zellinnern aber den gleichen Wirkort haben, einen synergistischen Effekt ergeben kann. Als Modellsubstanzen sollen hierfür das MSO und das Tripeptid-Derivat MSO-$(Ala)_2$ herangezogen werden.

Sideramin - Transport

Eisen ist ein zentraler Cofaktor zentraler Enzyme des Zellstoffwechsels. Dieses Spurenelement liegt bei pH7 unter aeroben Bedingungen als Eisen-III-Hydroxyd mit einer Löslichkeitskonstante von nur ca. 10^{-38} vor (NEILANDS, 1974). Mikroorganismen haben Komplexbildner, um das Eisen über spezifische Transportsysteme in die Zellen aufnehmen zu können (ROSENBERG und YOUNG, 1974). Diese Komplexbildner, in der Regel Catechole oder Hydroxamate (EMERY, 1971), werden von zahlreichen Mikroorganismen unter Eisenmangel synthetisiert und ins Außenmedium abgegeben (SNOW, 1970; BYERS, 1974). Siderochrome sind Trihydroxamat-Verbindungen, die sich hinsichtlich ihrer biologischen Eigenschaften in Wachstumsfaktoren (Sideramine) und Antibiotika (Sideromycine)

einteilen lassen (BICKEL et al., 1960; ZÄHNER et al., 1960, 1962).

Auf Grund der heute bekannten Strukturen der Siderochrome lassen sich zwei Gruppen einander gegenüberstellen: die Ferrichrome und die Ferrioxamine (Abb.3 a, b). Das Sideramin Ferricrocin ist ein Vertreter der Ferrichrom-Gruppe. Siderochrome der Ferricrocin-Reihe (Abb.3a) zeigen in Bezug auf Bakterien sowohl gegen Gram-negative als auch gegen Gram-positive Keime biologische Wirksamkeit, während die Wirkung der Ferrioxamine (Abb. 3 b) auf Gram-positive Organismen beschränkt ist.

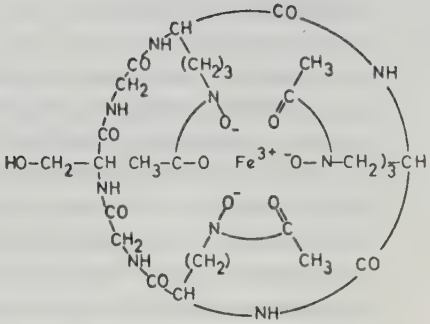
Sideromycine und Sideramine verwenden die gleichen Strukturbestandteile zur Eisenkomplexierung. Die Sideromycine unterscheiden sich von den Sideraminen durch einen zusätzlichen Strukturteil, der ihnen die antibakterielle Eigenschaft verleiht. Dieser Rest variiert bei den verschiedenen Sideromycinen und bedingt ihre unterschiedlichen Wirkungsmechanismen. Allerdings ist weder der primäre Wirkort der meisten Sideromycine noch der strukturelle Aufbau der verschiedenen Sideromycin-Seitenketten vollständig aufgeklärt (KNÜSEL und ZIMMERMANN, 1975; DENGLER, 1979). Die in Abbildung 3a dargestellte Struktur des Albomycins (TURKOVA et al., 1965) wird von MAEHR und PITCHER (1971) angezweifelt.

Der seit 1960 bekannte Antagonismus zwischen Sideromycinen und Sideraminen wurde zunächst in Zusammenhang mit der Wirkungsweise erklärt (ZÄHNER et al., 1960). Es konnte aber inzwischen gezeigt werden, daß zwischen der antibakteriellen Wirkung der Sideromycine und ihrer Funktion als Eisenchelatoren kein ursächlicher Zusammenhang besteht (NÜESCH und KNÜSEL, 1967).

FERRICROCIN- REIHE

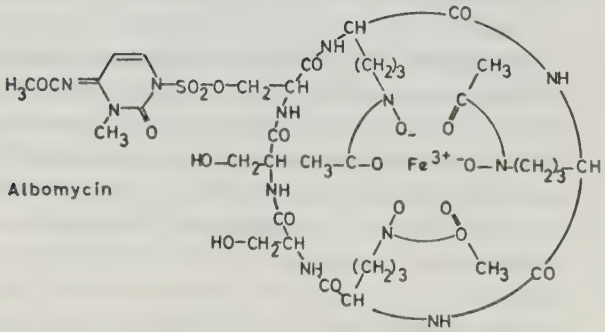
Sideramin

Ferricrocin



natürliches Sideromiycin

Albomycin



Semisynthetisches Sideromycin

6-Sulfanilamido-nicotinsäure-femicrocinylester

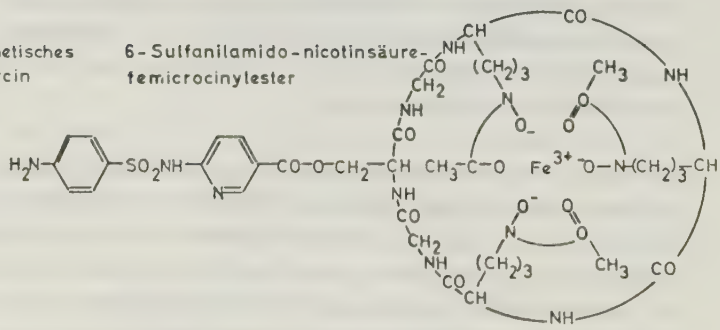
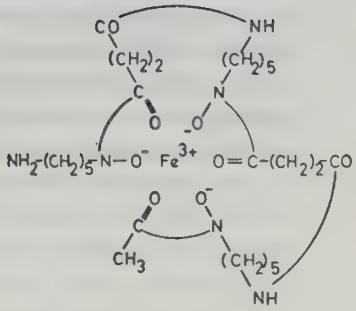


Abb.3 a : Chemische Struktur von Siderochromen der Ferricrocin-Reihe.

FERRIOXAMIN - REIHE

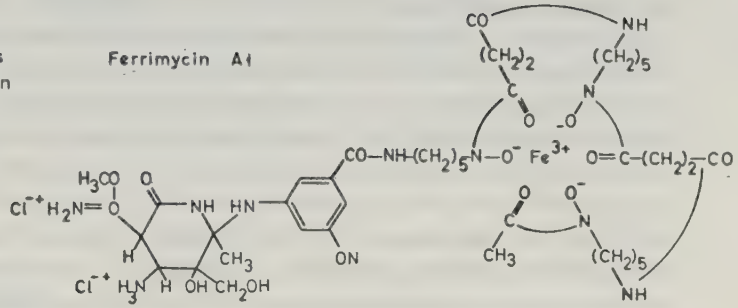
Sideramin

Ferrioxamin B



natürliches Sideromycin

Ferrimycin A1



Semisynthetisches Sideromycin

N-(6-sulfanilamido-nicotinoyl) - ferrioxamin B

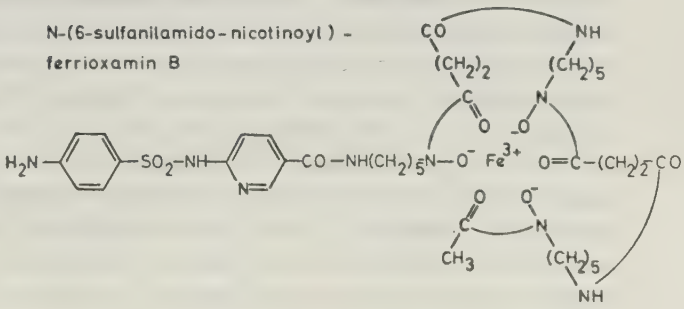


Abb.3 b : Chemische Struktur von Siderochromen der Ferrioxamin-Reihe

Das Sideramin Ferrioxamin B hebt in intakten Zellsystemen von Staphylococcus aureus und Bacillus subtilis die Hemmung der Preoteinsynthese durch das Sideromycin A 22765 kompetitiv auf. In zellfreinen Systemen hat es jedoch keinen Einfluß auf die antibiotische Wirkung. Hieraus kann gefolgert werden, daß der Antagonismus zwischen Sideromycinen und Sideraminen nicht auf einen gemeinsamen Wirkort zurückzuführen ist, sondern daß die Antibiotika mit den Sideraminen um die Permeation in die Zelle konkurrieren (KNÜSEL und ZIMMERMANN, 1975).

Sideromycine scheinen im Gegensatz zu Sideraminen in die Zellen aufgenommen zu werden. Das Sideromycin A 22765 wird von Staphylococcus aureus aktiv gegen ein Konzentrationsgefälle aus dem Medium aufgenommen, während Ferrioxamin B zwar die Aufnahme von A 22765 antagonisiert, aber nur in sehr geringen Mengen in den Zellen nachzuweisen ist. Der Transport ist temperaturabhängig und benötigt eine Energiequelle. Sideromycinresistente Keime zeigen nur eine äußerst geringe Permeabilität für A 22765, dagegen sind zellfreie Systeme, präpariert aus Sideromycin-resistenten Keimen, empfindlich gegen A 22765. Die Resistenz ist also in der Permeation begründet (ZIMMERMANN, 1970). Sideramine könne auf Grund ihres hohen Molekulargewichtes (um 1000) weder durch die wassergefüllten Poren der äußeren Membran von Gram-negativen Keimen diffundieren, da deren Ausschlußvolumen bei einem Molekulargewicht von 700 liegt (NAKAE und NIKAIDO, 1975; NAKAE, 1976, NIKAIDO et al., 1977), noch ist eine Permeation durch einfache Diffussion vorstellbar (NAEGELI, 1978). Für die Aufnahme der Substanzen durch die äußere Membran müssen also spezifische Poren vorhanden sein. HANTKE und BRAUN (1975 a, b, 1978) fanden, daß ein Protein der äußeren Membran, das tonA-Genprodukt, bisher charakterisiert als Rezep-

tor für die Phagen T1, T5 und Ø80 und für Colicin M, auch Bestandteil des Transportsystems für dreiwertiges Eisen in Form des Ferrichrom-Komplexes ist. Das Antibiotikum Albomycin bindet ebenfalls an diesen Rezeptor. Zusätzlich zum tonA-Genprodukt ist für die Bindung des Eisen-III-Komplexes ein weiteres Protein, das tonB-Genprodukt, notwendig. Dieses Protein ist außerdem erforderlich für die Eisenaufnahme als Enterochelin-Komplex und als Citrat-Komplex. Abbildung 4 zeigt die vier Membran-Proteine, die an der Eisenaufnahme von Escherichia coli beteiligt sind. Ein Verlust des tonA-Genproduktes führt zur Resistenz gegen die Phagen T1, T5 und Ø80, gegen Colicin M und gegen Albomycin. In intakten Zellen kann Ferrichrom oder Ferricrocin die toxische Wirkung der verschiedenen Komponenten aufheben. Eine detaillierte Beschreibung der komplexen Vorgänge bei der Eisenaufnahme von Escherichia coli findet man in den Arbeiten von BRAUN et al., (1976) und BRAUN (1978).

Die Sideromycine können als an Sideramin-Vehikel gekoppelte Wirkstoffe angesehen werden, die die Fähigkeit des Sideramin-Restes, an ein Rezeptorprotein zu binden, ausnutzen, um zumindest die wirksame Komponente des Moleküls in die Zelle zu bringen.

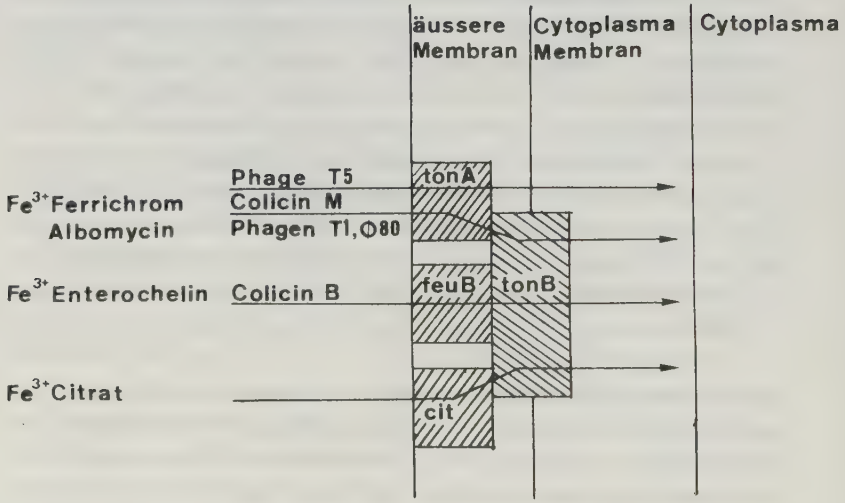


Abb.4 : Schematische Darstellung der an der Eisenaufnahme beteiligten Membran-Proteine bei Escherichia coli (verändert nach BRAUN (1978)).

Uns schien das Ferrichrom-Rezeptorsystem, das Spezifität für derart unterschiedliche Strukturen wie Phagen, Colicine und Siderochrome aufweist, als geeignet, um, analog zu dem natürlichen Antibiotikum Albomycin, Hemmstoffen durch Kopplung an ein Sideramin die Benutzung des aktiven Ferrichrom-Transportsystems zu ermöglichen. Für die Synthese semisynthetischer Sideromycine erwies sich das Ferricrocin als geeignete Ausgangssubstanz, da es eine einzige primäre Hydroxylgruppe im Serin-Rest besitzt, die funktionalisiert werden kann (NAEGELI, 1978). Als weitere Ausgangssubstanz wurde Ferrioxamin B gewählt, das sich auf Grund seiner primären terminalen Aminogruppe für diesen Zweck ebenfalls eignet (NAEGELI, 1978).

Als erste Modellsubstanzen für die Kopplung an Sideramine wurde Sulfonilamid gewählt. Kriterien für die Auswahl dieses Stoffes waren:

1. Die Substanz hat eine vergleichbare räumliche Ausdehnung wie die natürlichen Strukturteile der Sideromycine.
2. Die antimikrobielle Wirksamkeit läßt sich durch einfache biologische Untersuchungsmethoden spezifisch nachweisen.
3. Die genaue Kenntnis der Wirkungsweise als Antagonist der Folsäurebiosynthese ergibt die Möglichkeit eines späteren therapeutischen Einsatzes der Substanzen auf Grund ihrer geringen Toxizität.

In der vorliegenden Arbeit sollen Möglichkeiten eines aktiven Transports von natürlichen oder synthetischen Hemmstoffen in die Zellen von Mikroorganismen untersucht werden. Dabei stehen das Oligopeptid-Transportsystem und das Transportsystem für Sideramine im Vordergrund der Untersuchungen. Zunächst ist der Nachweis eines Hemmstofftransports über diese Transportsysteme zu erbringen. Sinn solcher Forschung ist es, Hemmstoffe für eine Anwendung in Medizin und Pflanzenschutz zugänglich zu machen, das heißt, sie chemisch so zu verändern, daß sie nach Kopplung an bestimmte Vehikel über deren aktive Transportsysteme gelangen. Dadurch können die Wirkung von Hemmstoffen verstärkt und Wirkungsspektren erweitert werden. Durch Ausnutzung mehrerer Transportwege zur Einschleusung von Hemmstoffen kann vielleicht ein synergistischer Effekt erreicht werden. Auf alle Fälle eröffnen sich neue Wege zur Überwindung von Eindringungsresistenz.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. CHEMIKALIEN

Mit Ausnahme der unten aufgeführten Reagentien wurden analysenreine Präparate der Firma Merck AG, Darmstadt verwendet.

2.1.1. Chemikalien für Nährmedien; Peptide

Difco Laboratories, Detroit, U.S.A.:
- Bacto-Agar
- Bacto-Malt-Extract
- Bacto-Nutrient-Agar
- Casamino acids, vitamin-free

Bio Rad Laboratories, Richmond, U.S.A.:
- Chelex 100

Deutsche Maizenawerke, Hamburg:
- D-Glucose

Fluka AG, Buchs, Schweiz:
- Methioninsulfon (MSO)
- $(Ala)_2$

Serva Feinbiochemica, Heidelberg:
- Ala-Gly
- Ala-Val
- Gly-Ala
- $(Met)_3$

Sigma Chemical Company, St. Louis, U.S.A.:

$(Ala)_3$	$(Gly)_2$-Ala
$(Ala)_4$	$(Lys)_2$
$(Ala)_5$	$(Lys)_3$
$(Ala)_6$	$(Gly)_2$-Phe
$(Gly)_2$	$(Phe)_4$
$(Gly)_3$	$(Ser)_3$
Sulfanilamid	

Arbeitsgruppe Prof. Dr. G. Jung, Institut für Organische Chemie, Universität Tübingen:

$(Orn)_3$
MSO-$(Ala)_2$

2.1.2. Antibiotika

Alle in dieser Arbeit verwendeten, hier nicht speziell aufgeführten Antibiotika sind der Antibiotikasammlung des Lehrstuhls für Mikrobiologie I, Universität Tübingen entnommen.

Dr. Hennes, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen:
Alaphosphin (Ro 03-7008)

Dr. E. L. Patterson, American Cyanid Company, Lederle Laboratories, New York, U.S.A.:
Alazopeptin

Dr. B.B. Molloy, Eli Lilly & Co., Indianapolis, U.S.A.:
Fumarylcarboxyamido-L-2,3-diaminopropionyl-L-alanin

Dr. A. Stempel, Hoffmann-La Roche Inc., Nutley, U.S.A.:
L-(N^5-Phosphono)methionin-S-sulfoximinyl-alanyl-alanin

Dr. A. Hirota, Derpartment of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, University of Osaka Prefecture, Osaka, Japan:
Plumbemycin B

2.1.3. Sideramin-Derivate

Ciba AG, Basel, Schweiz:
N-P-Aethoxyphenyl-acetyl-ferrioxamin B
N-p-Chlorphenylacetyl-ferrioxamin B

Arbeitsgruppe Prof. Dr. W. Keller-Schierlein, Laboratorium für organische Chemie, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich, Schweiz:
6-Sulfanilamido-nicotinsäure-ferricrocinylester
N-Sulfaninyl-ferrioxamin B
N-(Sulfaninyl-carbamoyl)-ferrioxamin B
N-(6-Sulfanilamido-nicotinoyl)-ferrioxamin B
Nalidixinsäure-ferricrocinylester
4-Nalidixinoylamino-nicotinsäure-ferricrocinylester
N-Nalidixinoyl-ferrioxamin B
N-(4-Nalidixinoylamino-nicotinoyl)-ferrioxamin B
O-(Pyridyl-3-carbamoyl)-desferriferricrocin

2.2. NÄHRMEDIEN

M I: (Escherichia coli K-12, Bacillus subtilis) modifiziert nach DAVIS and MINGIOLI (1950)

KH_2PO_4	3,0 g
K_2HPO_4	7,0 g
NaCl	0,1 g
$(NH_4)_2SO_4$	1,0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1 g
D-Glucose	4,0 g
H_2O deion.	1,0 l

M I-Fe: (Eisenmangelmedium für Escherichia coli K-12)

KH_2PO_4	3,0 g	Extraktion von Eisen mit Hilfe von Chelex 100
K_2HPO_4	7,0 g	
NaCl	0,1 g	
$(NH_4)_2SO_4$	1,0 g	
$MgSO_4$	0,1 g	
D-Glucose	4,0 g	
H_2O bidest.	1,0 l	

Bei der Anfertigung von Testplatten mit Escherichia coli wurde den Medien zum Zeitpunkt der Zugabe der Bakteriensuspension 0,2 g/l 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (gelöst in Äthanol) zugesetzt.

M II: (Staphylococcus aureus)

Gleiche Zusammensetzung wie M I, zusätzlich	
Casamino acids, vitamin-free	1,0 g
Thiamin	0,05 g
Nicotinsäure	0,05 g

M III: (Organismen des Wirkungsspektrums)

Gleiche Zusammensetzung wie M I, zusätzlich	
Casamino acids, vitamin-free	10,0 g

M IV: (Organismen des Wirkungsspektrums)

Bacto-Malt-Extract	20,0 g
H_2O deion.	1,0 l

Zur Herstellung fester Nährböden wurden den Medien 15g/l Agar zugesetzt.
Glucose wurde grundsätzlich separat sterilisiert.
Die Thiaminlösung wurde 5 min bei 120°C, die anderen Nährlösungsbestandteile 20 min bei 120°C autoklaviert.

2.3. MIKROORGANISMEN

Bei der Durchführung dieser Arbeit wurden folgende Mikroorganismen verwendet:

2.3.1. Bakterien

Eubacteriales, Gram-negativ

Achromobacter geminiani-Göttingen
Agrobacterium tumefaciens (Smith et Townsend) Cohn-ATCC 11095
Erwinia amylovora-Tü,EMS
Erwinia carotovora-Tü,EMS
Escherichia coli (Migula) Castellani et Chalmers-K-12 W 945, Köln
Escherichia coli (Migula) Castellani et Chalmers-K-12 W 1485, Köln
Escherichia coli K-12 ROW/V/R2, 1 (feuB$^-$) - Tü,MII 318
Escherichia coli KL 226 (tonA$^-$) - Tü,MII 130
Proteus vulgaris - NCTC 4157
Salmonella minnesota R3 - SF 117 - Tü,MII 47
Salmonella typhimurium LT2 (Loeffler) Castellani et Chalmers-Stocker,Stanford,U.S.A
Xanthomonas campestris (Dr. Scheinpflug), Bayer-Leverkusen

Eubacteriales, Gram-positiv

Bacillus brevis Migula - ATCC 9999
Bacillus subtilis Cohn - ATCC 6051
Corynebacterium rathayi (Smith) Dowson - ATCC 13659
Staphylococcous aureus Rosenbach - ETH 2070Z

Pseudomonales

Pseudomonas fluoreszens Migula - ATCC 13425 Pseudomonas lachrymans (Smyth and Bryan) Carsher-B-19, Bayer Leverkusen
Pseudomonas syringae - Tü,EMS

Actinomycetales

Mycobacterium phlei Lehmann and Neumann - ATCC 354
Streptomyces violaceoruber (Waksman et Curtis)-Tü 22
Streptomyces viridochromogenes (Krainsky) Waksman et Hendrici - Tü 57
Streptomyces viridochromogenes (Krainsky) Waksman et Hendrici - Tü 494

2.3.2. Pilze

Ascomycetes und Deuteromycetes

Botrytis cinerea Person ex Fries - Tü 157
Candida albicans (Robin) Berkhout - Tü 565
Colletrichum trifolii - Tü,EMS
Fusarium oxysporum - Tü,EMS
Neurospora crassa - Tü,EMS
Paecilomyces varioti Bainier - Tü 137
Saccharomyces cerevisiae Hansen - Tü 125
Thielavopsis basicola - Tü,EMS

Basidiomycetes

Rhizoctonia solani - Tü,EMS
Rhodotorula spec. - Institut für spez. Botanik, Universität Tübingen
Ustilago maydis (Beckmann) Unger - Tü 567

Oomycetes

Phytium debaryanum Hesse - CBS 114.19
Saprolegnia asterophora de Bary - CBS 180.44

Zygomycetes

Mucor hiemalis Wehmer - (+) Tü 179 x (-) Tü 180
Mucor miehei Cooney et Emerson - Tü 284

2.3.3. Phagen

Alle hier aufgeführten Phagen sind der Stammsammlung des Lehrstuhls für Mikrobiologie II, Universität Tübingen entnommen.

BF1, BR2, BR10, Ffm, Fo, P1, P22, PF1, PF3, T1, T2, T4, T6, T7

2.4. BIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGSMETHODEN

2.4.1. Isolierung des Rohprodukts von L-Phosphinothricyl-alanyl-alanin

Die Fermentation des Produzentenstammes Streptomyces viridochromogenes (Tü 494) und die Isolierung des Antibiotikums L-Phosphinothricyl-alanyl-alanin wurden bei GUGEL (1971) beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde ein an Aktivkohle gereinigtes, flüssiges Rohprodukt verwendet, das 0,1 mg PTC-$(Ala)_2$/ml enthielt.

2.4.2. Plattendiffusionstest

Dieser Test, nach ZÄHNER und MAAS (1972) durchgeführt, diente zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität verschiedener Hemmstoffe. Die Vorbereitung des Impfmaterials und die Anfertigung der Testplatten sind bei PORALLA (1967), HÖHNE (1974) und FIEDLER (1976) beschrieben. Die Inkubationstemperaturen und Medien sind im Ergebnisteil angegeben.

Zur Untersuchung der Wirksamkeit semisynthetischer Sideromycine gegen Escherichia coli K-12 wurde der Test wie folgt modifiziert: Der Testorganismus wurde 16 Stunden unter Eisenmangel-Bedingungen vorkultiviert (Medium: M I-Fe) und mit sterilem Medium M I-Fe bis auf eine Extinktion von E_{578} = 0,1 verdünnt. 100 ml des Mediums M I-Fe wurden mit 0,1 ml dieser Suspension beimpft. Das entspricht einer Einsaatdichte von 4×10^4 Zellen / ml.

2.4.3. Kreuztest

Die gegenseitige Beeinflussung verschiedener Substanzen wurde mit Hilfe von Kreuztests, durchgeführt nach ZÄHNER und MAAS (1972) untersucht.

2.4.4. Verdünnungsreihentest

Zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) antibakteriell wirksamer Substanzen wurde der Verdünnungsreihentest, modifiziert nach ZÄHNER und MAAS (1972) angewendet.
16 Stunden gewachsene Kulturen der entsprechenden Testorganismen stellte man mit Saline (0.9% NaCl-Lösung) auf eine Extinktion von E_{578} = 0,1 ein. Diese Suspension wurde mit Medium nochmals 1:100 verdünnt. Teströhrchen (Rundküvetten von der Fa. Bausch & Lomb), die je 3 ml dieser Suspension und je 30 µl der entsprechenden Hemmstofflösung enthielten, wurden bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 8 - 16 Stunden wurde die Transmission der Suspension im Photometer "Spectronic 20" (Fa. Bausch & Lomb) bei einer Wellenlänge von 578 mm bestimmt. Diejenige Konzentration wurde als MHK bezeichnet, bei der eine Wachstumshemmung von 90-100% im Vergleich zum Kontrollansatz zu verzeichnen war.

2.4.5. Biophotometerversuche

Für die Aufnahme von Wachstumskurven, zur Bestimmung von minimalen Hemmkonzentrationen und für Kompetitionsversuche wurde ein Biophotometer (Fa. Jouan, Paris) benutzt. Dieses Gerät zur automatischen Registrierung des Wachstums bei Bakterien ist bei PORALLA (1967) beschrieben.

Die Anzucht der Testorganismen erfolgte in Flüssigkultur 16-18 Stunden bei 37°C im Schüttelwasserbad. 1 ml dieser Vorkultur wurde in frisches Medium überimpft und unter gleichen Bedingungen bis zu einer Transmission von 90% (578 nm) weiterinkubiert. Je 7,5 ml dieser Bakteriensuspension wurden in Biophotometerküvetten gegeben und der Schreiber des Gerätes auf die Transmission von 90% eingestellt. Die Küvetten wurden bei 37°C und bei maximaler Frequenz und Amplitude des Magnetrührers inkubiert. Der Zeitpunkt der Zugabe von Metaboliten und Antimetaboliten ist im Ergebnisteil angegeben.

2.4.6. Isolierung L-Phosphinothricyl-alanyl-alanin-resistenter Mutanten von Escherichia coli K-12

Zur Isolierung von PTC-$(Ala)_2$-resistenten Stämmen wurden je 0,1 ml einer Bakteriensuspension der Extinktion E_{578}=0,1 auf Agarplatten (M I unter Zusatz von 0,2 µg/ml PTC-$(Ala)_2$ ausplattiert. Dies entspricht einer Zellzahl von 4×10^6 Keimen pro Platte. Nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden wurden die gewachsenen Kolonien abgeimpft und zur vollständigen Entfernung von Wildtypzellen einem Verdünnungsausstrich auf Antibiotikum-Agar unterworfen. Die Mutanten wurden durch ihre Sensitivität gegen Phagen und gegen die in Tabelle 4 aufgeführten Antibiotika charakterisiert.

2.4.7. Phagenversuche

Anfertigung der Testplatten:
Unterschicht: 10 ml Nutrient-Agar
Oberschicht: 3 ml 0,64% Nutrient-Agar mit
1 Tropfen einer Übernachtkultur des
jeweiligen Testorganismus

Im Auftropftest wurden von jeder Phagensuspension je 10 µl auf die verschiedenen Testorganismen gegeben. Der Phagentiter betrug in diesem Versuch ca. 10^7 - 10^8 plaquebildende Einheiten pro ml.

2.4.8. Isolierung L-Phosphinothricyl-alanyl-alanin-resistenter Mutanten von Bacillus subtilis

Testplatten von Bacillus subtilis wurden mit PTC-$(Ala)_2$-getränkten Filterrondellen belegt und 48 Stunden inkubiert. Einzelne Kolonien, die im Hemmhof wuchsen, wurden abgeimpft und auf M I, unter Zusatz von 0,2 µg/ml PTC-$(Ala)_2$ ausgestrichen. Die Mutanten wurden durch ihre Sensitivität gegen toxische Tripeptide und gegen die in Tabelle 4 aufgeführten Antibiotika charakterisiert.

2.4.9. Isolierung Albomycin-resistenter Mutanten von Staphylococcus aureus 2070Z

Die Isolierung Sideromycin-resistenter Keime von Staphylococcus aureus wurde analog zu der unter 2.4.8. beschriebenen Methode mit Albomycin durchgeführt. Die Charakterisierung der Mutanten erfolgte über Untersuchungen der Kreuzresistenz mit den Sideromycinen Ferrimycin und A 22765 und der Sensitivität gegen die Antibiotika Actinomycin, Bacitracin, Chloramphenicol, D-Cycloserin, Erythromycin, Tetracyclin und Vancomycin.

3. E R G E B N I S S E

3.1. TRANSPORT VON ANTIBIOTIKA ÜBER DAS OLIGOPEPTID-TRANSPORTSYSTEM VON ESCHERICHIA COLI K-12

3.1.1. Transport der Tripeptid-Antibiotika L-Phosphinothricyl-alanyl-alanin, L-(N^5-Phosphono)methionin-S-sulfoximinyl-alanyl-alanin und Plumbemycin B

3.1.1.1. Kompetitionsversuche mit Peptiden

Die molekularen Strukturen der Tripeptid-Antibiotika PTC-$(Ala)_2$ und PMS-$(Ala)_2$, beides Hemmstoffe der Glutaminsynthetase, und des Threonin-Antagonisten Plumbemycin B entsprechen den Spezifitätsanforderungen des OPT-Systems (Abb. 2). Die Aufnahme dieser Antibiotika in Zellen von Escherichia coli K-12 über das OPT-System wurde zunächst in Antagonismustests untersucht. In Kreuztests wurde geprüft, in wieweit die wachstumshemmende Wirkung der Tripeptid-Antibiotika durch verschiedene Peptide beeinflußt wird. Die Resultate der Kreuztests sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Hierbei zeigte sich, daß Peptide, die den strukturellen Anforderungen des OPT-Systems genügen, die antibakterielle Aktivität der Antibiotika aufheben können. Das Bild der Aufhebung entspricht in fast allen Fällen dem eines kompetitiven Antagonismus. Eine Ausnahme bildet Gly-$(Phe)_2$, das eine fast komplette, nicht kompetitive Aufhebung der Antibiotika zeigt. Als Beispiel für das Ergebnis eines Kreuztests ist in Abbildung 5 der kompetitive Antagonismus zwischen PTC-$(Ala)_2$ und $(Ala)_3$

dargestellt. Substanzen, die nicht oder nur in geringem Maße das OPT-System benutzen (Glutathion, Dipeptide), zeigen in der in Tabelle 2 angegebenen Konzentration keinen Einfluß auf die Wirksamkeit der Antibiotika.

Als Vergleichssubstanz diente in diesen Versuchen das toxische Tripeptid $(Orn)_3$, für das der Transport über das OPT-System beschrieben wurde (GILVARG und LEVIN, 1972; DE FELICE et al., 1973; BARAK und GILVARG, 1974). Das charakteristische Aufhebungsmuster der Hemmstoffe durch die verschiedenen Peptide entspricht vollständig dem für $(Orn)_3$.

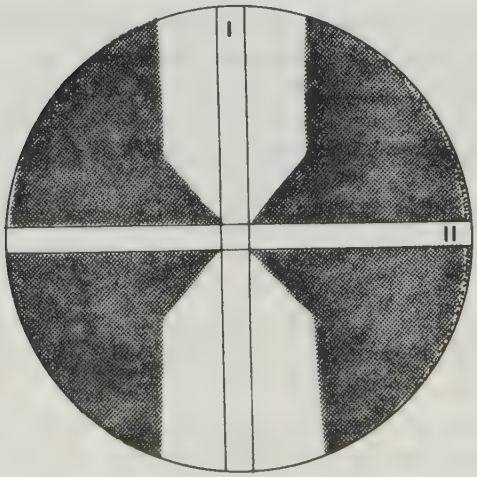


Abb. 5: Kompetitiver Antagonismus zwischen PTC-$(Ala)_2$ und $(Ala)_3$ im Kreuztest. Testorganismus: Escherichia coli K-12; Filterstreifen I: 10 µM PTC-$(Ala)_2$; Filterstreifen II: 5 mM $(Ala)_3$.

Tab. 2: Kreuztests mit Tripeptid-Hemmstoffen und verschiedenen Peptiden.
Testorganismus: Escherichia coli K-12;
k : kompetitiver Antagonismus;
++: nicht kompetitiver Antagonismus;
- : kein Antagonismus.

Peptide	Hemmstoffe			
(5 mM)	PTC-$(Ala)_2$ (0,01 mM)	PMS-$(Ala)_2$ (0,5 mM)	Plumbemycin B (5 mM)	$(Orn)_3$ (20 mM)
$(Ala)_2$	-	-	-	-
$(Ala)_3$	k	k	k	k
$(Ala)_4$	k	k	k	k
$(Ala)_5$	k	k	k	k
$(Ala)_6$	k	k	k	k
$(Gly)_2$	-	-	-	-
$(Gly)_3$	k	k	k	k
$(Gly)_2$-Ala	k	k	k	k
Gly-$(Phe)_2$	++	++	++	++
$(Lys)_2$	-	-	-	-
$(Lys)_3$	k	k	k	k
$(Met)_3$	k	k	k	k
$(Phe)_4$	-	-	-	-
$(Ser)_3$	k	k	k	k
Glutathion	-	-	-	-

Zur Quantifizierung der Aufhebung des PTC-$(Ala)_2$ durch verschiedene Peptide wurden Versuche im Biophotometer durchgeführt. Die Zugabe der entsprechenden Peptide erfolgte direkt vor der Zugabe des Antibiotikums in der logarithmischen Wachstumsphase bei einer Transmission von 70%. Die Biophotometerkurven sind in den Abbildungen 6-9 wiedergegeben. Die OPT-transportierten

Peptide $(Ala)_3$ (Abb. 6) und $(Lys)_3$ (Abb. 7) zeigen eine qualitativ und quantitativ vergleichbare Kompetition mit PTC-$(Ala)_2$ um die Aufnahme in die Zelle. $(Met)_3$, das laut NAIDER und BECKER (1975) und BARAK und GILVARG (1975 b) zusätzlich über ein weiteres Petptid-Transportsystem "OPR", mit einer erhöhten Seitenkettenspezifität, aufgenommen wird, zeigt kaum geringere Kapazität bei der Konkurrenz um den OPT-Rezptor (Abb. 9).

Das Dipeptid $(Ala)_2$ hingegen, das sowohl das Dipeptid-Transportsystem (DPT) als auch das OPT-System benutzen kann (PAYNE und GILVARG, 1971), erreicht eine Aufhebung der Hemmung erst bei einer Konzentration, die im Vergleich zu den Tripeptiden um einen Faktor von ca. 100 höher liegt (Abb. 5).

Mit Glutathion, das auf Grund seiner γ-Peptidbindung nicht der Strukturspezifizität des OPT-Systems entspricht (PAYNE, 1972), konnte keine Beeinflussung der Aufnahme des PTC-$(Ala)_2$ bis zu einer Konzentration von 100 mM erreicht werden.

Aus den Biophotometerkurven geht hervor, daß erst bei einer Konzentration von 100 µM $(Ala)_3$ resp. $(Lys)_3$ über die ganze Zeit der logarithmischen Wachstumsphase die Aufnahme und Akkumulation des PTC-$(Ala)_2$ und damit das Erreichen der zur Hemmung notwendigen intrazellularen Konzentration blockiert ist. Das entspricht einem molaren Konzentrationsverhältnis von Peptid zu Antibiotikum von 5000:1. Die zeitliche Dauer bis zum Eintritt der Hemmwirkung nimmt mit steigender Peptidkonzentration zu. Bis zum Wirkungseintritt besteht maximale Wachstumsgeschwindigkeit des Testorganismus.

Pipettierte man Peptidlösungen mit einer Konzentration von 100 µM 1/4, 1, 2 oder 3 Stunden nach der Zugabe des Antibiotikums in die Küvetten, so ließ sich die Hemmwirkung des Antibiotikums nicht mehr aufheben. Nach diesem Versuch ist der oben beschriebene Effekt zwischen den Substanzen als Konkurrenz um das gleiche Transport-System zu erklären und nicht auf der Ebene der Wirkungsweise des Antibiotikums zu suchen.

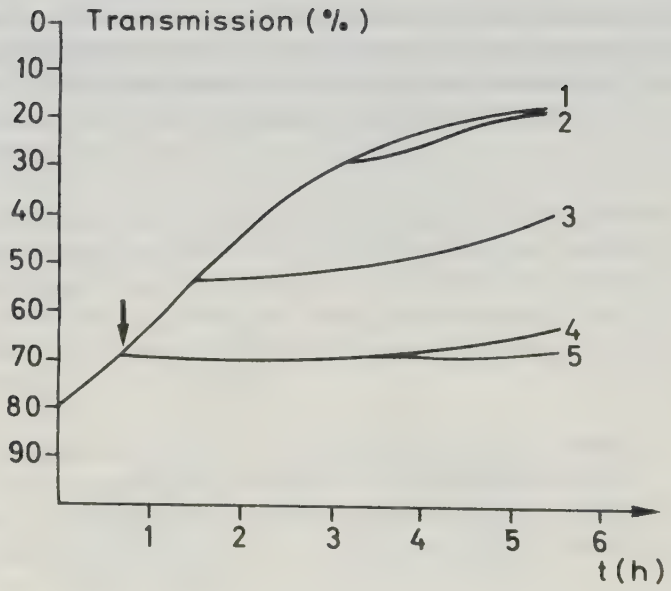


Abb. 6: Aufhebung der Hemmwirkung des PTC-$(Ala)_2$ durch $(Ala)_3$ bei Escherichia coli K-12.
1: Kontrolle
2: 0,02 µM PTC-$(Ala)_2$ + 100 µM $(Ala)_3$
3: 0,02 µM PTC-$(Ala)_2$ + 10 µM $(Ala)_3$
4: 0,02 µM PTC-$(Ala)_2$ + 1 µM $(Ala)_3$
5: 0,02 µM PTC-$(Ala)_2$

Die entsprechenden Mengen $(Ala)_3$ und das Antibiotikum wurden zu dem durch den Pfeil gekennzeichneten Zeitpunkt zugegeben.

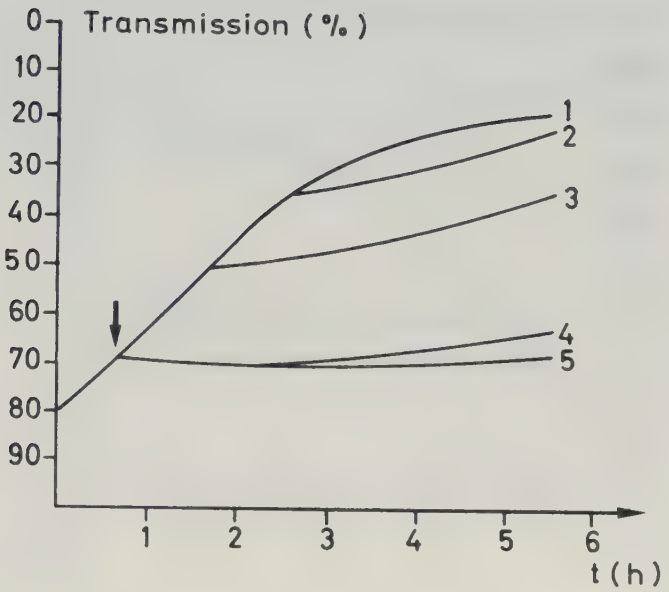


Abb. 7: Aufhebung der Hemmwirkung des PTC-$(Ala)_2$ durch $(Lys)_3$ bei Escherichia coli K-12.
1: Kontrolle
2: 0,02 µM PTC-$(Ala)_2$ + 100 µM $(Lys)_3$
3: 0,02 µM PTC-$(Ala)_2$ + 10 µM $(Lys)_3$
4: 0,02 µM PTC-$(Ala)_2$ + 1 µM $(Lys)_3$
5: 0,02 µM PTC-$(Ala)_2$

Die entsprechenden Mengen $(Lys)_3$ und das Antibiotikum wurden zu dem durch den Pfeil gekennzeichneten Zeitpunkt zugegegeben.

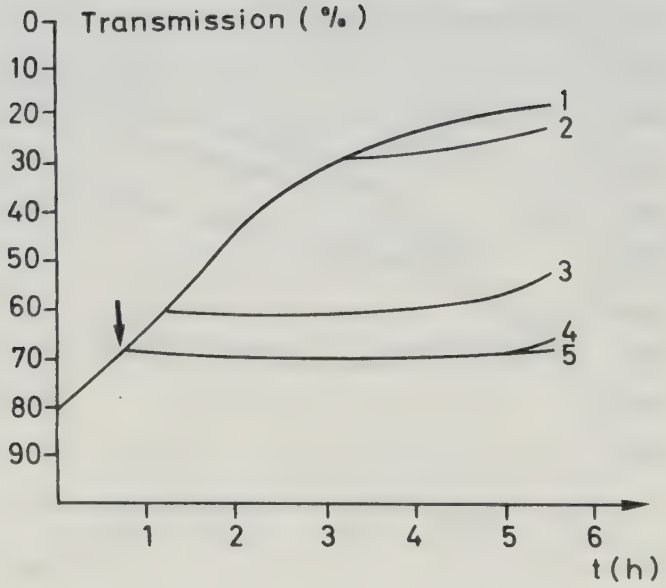


Abb. 8: Aufhebung der Hemmwirkung des PTC-$(Ala)_2$ durch $(Met)_3$ bei Escherichia coli K-12.
1: Kontrolle
2: 0,02 µM PTC-$(Ala)_2$ + 100 µM $(Met)_3$
3: 0,02 µM PTC-$(Ala)_2$ + 10 µM $(Met)_3$
4: 0,02 µM PTC-$(Ala)_2$ + 1 µM $(Met)_3$
5: 0,02 µM PTC-$(Ala)_2$

Die entsprechenden Mengen $(Met)_3$ und das Antibiotikum wurden zu dem durch den Pfeil gekennzeichneten Zeitpunkt zugegeben.

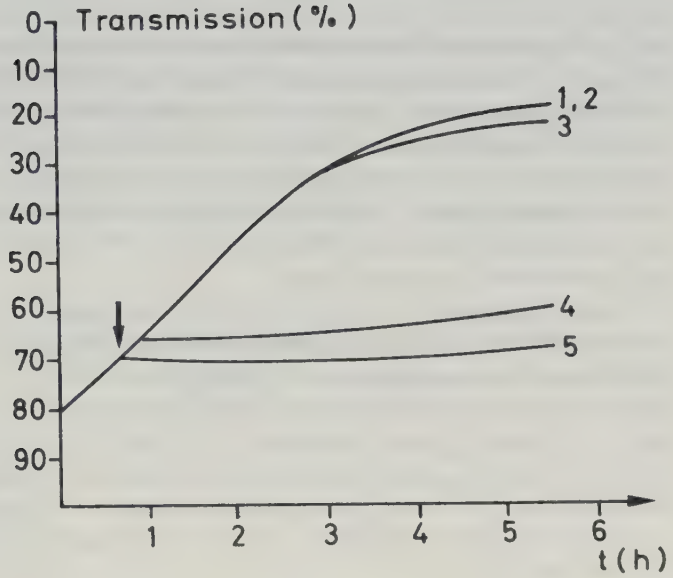


Abb. 9: Aufhebung der Hemmwirkung des PTC-$(Ala)_2$ durch $(Ala)_3$ bei Escherichia coli K-12.
1: Kontrolle
2: 0,02 µM PTC-$(Ala)_2$ + 100 mM $(Ala)_2$
3: 0,02 µM PTC-$(Ala)_2$ + 10 mM $(Ala)_2$
4: 0,02 µM PTC-$(Ala)_2$ + 1 mM $(Ala)_2$
5: 0,02 µM PTC-$(Ala)_2$

Die entsprechenden Mengen $(Ala)_2$ und das Antibiotikum wurden zu dem durch den Pfeil gekennzeichneten Zeitpunkt zugegeben.

3.1.1.2. Isolierung und Charakterisierung L-Phosphinothricyl-alanyl-analin-resistenter Mutanten von Escherichia coli K-12

Wie im Methodenteil beschrieben, wurden Mutanten isoliert, die Resistenz gegen das Tripetptid Antibiotikum PTC-$(Ala)_2$ aufwiesen. Die Mutationsrate dieser Spontanmutanten liegt bei 10^{-5}. Das entspricht den von BARAK und GILVARG (1974) beschriebenen Daten. Um unspezifische Veränderungen an der Zellwand als Ursache für die Resistenz auszuschließen, wurden die Mutanten folgendermaßen charkaterisiert:

Die Intaktheit der äußeren Membran wurde durch einen Vergleich des Phagenmusters des Wildtyps und der PTC-$(Ala)_2$-Mutanten bestätigt. Für diesen Versuch wurden folgende Phagen verwendet: BF1, BR2, BR10, Ffm, Fo, P1, P22, PF1, PF3, T1, T2, T4, T6, T7. Bei allen 10 untersuchten PTC-$(Ala)_2$-resistenten Mutanten entsprach die Empfindlichkeit gegen die einzelnen Phagen völlig der des Wildtyps.

Weiterhin wurde die Intaktheit der Zellwand über die Sensitivität von Wildtyp und Mutanten gegen eine Anzahl verschiedener Antibiotika (s. Tab. 4) überprüft und bestätigt.

Die Mutanten ließen sich nach ihrer Empfindlichkeit gegen das toxische Tripetptid $(Orn)_3$ in zwei Gruppen aufteilen (Tab. 3): Die als PR I bezeichneten Mutanten zeigten volle Kreuzresistenz mit PMS-$(Ala)_2$ Plumbemycin B und $(Orn)_3$. Die Kreuzresistenz mit $(Orn)_3$ spricht für einen Defekt am OPT-System, da $(Orn)_3$ nur als intaktes Molekül in der Zelle wirksam ist (GILVARG und LEVIN, 1972).

Diese Gruppe dürfte mit den (Opp^-) Mutanten von BARAK und GILVARG (1974) identisch sein.

Eine der PTC-$(Ala)_2$-resistenten Mutanten, hier als PR II bezeichnet, zeigte Kreuzresistenz mit PMS-$(Ala)_2$ und Plumbemycin B, war jedoch sensitiv gegen $(Orn)_3$. Dies läßt auf einen Defekt an der intrazellularen Peptidase schließen, da zumindest zwei der hier bearbeiteten Antibiotika im Zellinnern gespalten werden müssen, um aktiv werden zu können (BAYER et al.,1972; PRUESS et al., 1973)

Tab. 3 Antibakterielle Wirkung von Tripeptid-Hemmstoffen gegen Escherichia coli K-12 und die PTC-$(Ala)_2$-resistenten Mutanten PR I und PR II im Plattendiffusionstest.

Hemmstoff	Konz.	Hemmstoffdurchmesser (mm)		
	(mM)	E. coli K-12	PR I	PR II
PTC-$(Ala)_2$	0,4	43	24	30
	0,04	33	-	-
	0,013	26	-	-
PMS-$(Ala)_2$	0,5	29	-	-
	0,1	21	-	-
	0,01	16	-	-
Plumbemycin B	10,0	35	-	-
	5,0	31	-	-
	1,0	22	-	-
$(Orn)_3$	20,0	22	-	18

Die Bedeutung des OPT-Systems für die Mikroorganismen wurde durch einen Vergleich des Wachstums von Wildtyp und Mutanten auf verschiedenen Medien überprüft. Im Biophotometer zeigte sich kein Unterschied der Wachstumsgeschwindigkeit der verschiedenen Testorganismen, weder bei Wachstum auf Vollmedium (Nutrient Broth) noch auf Minimalmedium (M I). Lediglich die lag-Phase war bei den Mutanten um ca. 30 Minuten verzögert.

3.1.2. Aufnahme eines Antibiotika-Spektrums

Zur Charakterisierung von Mutanten und zur weiteren Klärung der Spezifizität des OPT-Systems wurde die Hemmwirkung zahlreicher Antibiotika (Tab. 4) im Plattendiffusionstest gegen Escherichia coli K-12 und die OPT-Mutante PR I untersucht.

Tab. 4: Vergleich der Wirkung verschiedener Antibiotika gegen Escherichia coli K-12 und die OPT-Mutante PR I im Plattendiffusionstest.
Konzentration von Alazopeptin: 50 µg/ml;
Konzentration der anderen Antibiotika: 1 mg/ml;
( ): inkomplette Hemmung;
Sp : spurweise Hemmung;
- : keine Hemmung.

Antibiotika	Hemmhofdurchmesser (mm)	
	E.coli K-12	E.coli K-12 PR I
Actinobolin	(12)	(12)
Actinomycin	-	-
Alazopeptin	35	22
Albomycin	28	28
Azaserin	12	13
Azomycin	33	31
Bacitracin	-	-
Chloramphenicol	29	28

Tab. 4: Fortsetzung

Antibiotika	Hemmhofdurchmesser (mm)	
	E. coli K-12	E. coli K-12 PR I
Chlorothricin	-	-
Cinerubin	-	-
Cinnamycin	12	12
D-Cycloserin	10	10
Duramycin	Sp	Sp
Erythromycin	Sp	Sp
Eulicin	(10)	(10)
Ferrimycin	-	-
Flavomycin	15	15
Fusidinsäure	-	-
Holomycin	-	-
Kasugamycin	20	18
Ketomycin	16	15
Kirromycin	-	-
Lancacidin	Sp	Sp
Lancamycin	-	-
Neomycin	21	21
Nojirimycin	-	-
Novobiocin	-	-
Oleandomycin	-	-
Penicillin G	18	18
Phleomycin	19	17
Phytoactin	-	-
Picromycin	-	-
Polymyxin B	19	18
Rifampicin	21	19
Spiramycin	-	-
Stenothricin	-	-
Streptogramin	-	-
Streptomycin	24	23
Streptovaricin	Sp	Sp
Tetracyclin	36	36
Thiolutin	15	15

Tab. 4: Fortsetzung

Antibiotika	Hemmhofdurchmesser(mm)	
	E. coli K-12	E. coli K-12 PR I
Valinomycin	-	-
Vancomycin	-	-
Venturicidin	-	-
Viomycin	-	-

Nur eines der untersuchten Antibiotika zeigte einen signifikanten Unterschied in der Wirkungsintensität zwischen Wildtyp und Mutante. Bei diesem Antibiotikum, Alazopeptin, wurde bei einer Konzentration von 50 µg/ml auf Testplatten mit dem Wildtyp ein Hemmhofdurchmesser von 35 mm festgestellt, während der Durchmesser des Hemmhofes bei der Mutante nur 22 mm betrug. In Kreuztests ließ sich die Alazopeptin-Wirkung jedoch nur sehr schwach durch Peptide aufheben. Alazopeptin, ein Hemmstoff der Glutamin-Synthetase (PATTERSON et al., 1966), ist aufgebaut aus einem Molekül L-Alanin und zwei Molekülen 6-Diazo-5-oxo-L-norleucin (DON).

3.2. VERBREITUNG VON PEPTID-TRANSPORT-SYSTEMEN BEI VERSCHIEDENEN MIKROORGANISMEN

3.2.1. Transport von L-Phosphinothricyl-alanyl-alanin

Zum Nachweis der Verbreitung des OPT-Systems bei verschiedenen Mikroorganismen wurde eine Anzahl Testkeime zunächst im Plattendiffusionstest auf ihre Empfindlichkeit gegen PTC-$(Ala)_2$ untersucht. Bei der Auswahl der

Organismen zur Klärung dieser Frage wurde unter Berücksichtigung eines später möglichen Einsatzes von Peptid-Hemmstoffen im Pflanzenschutz besonderes Gewicht auf phytopathogene Keime gelegt. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 5 aufgeführt.

Keime, die Sensitivität gegen PTC-$(Ala)_2$ aufwiesen, wurden anschließend Kreuztests mit PTC-$(Ala)_2$ und verschiedenen Peptiden unterworfen.

Bei Streptomyces violaceoruber, Tü 22 und Streptomyces viridochromogenes, Tü 57 sowie bei den Pilzen Phytium debaryanum und Rhizoctonia solani konnte die Wirkung des Antibiotikums auch durch hohe Peptid-Konzentrationen (100 µM) nur sehr schwach aufgehoben werden.

Im Kreuztest mit den in Tabelle 6 aufgeführten Stämmen zeigten die Peptide $(Ala)_3$, $(Ala)_5$, und $(Ser)_3$ eine kompetitive Aufhebung der PTC-$(Ala)_2$-Aktivität. $(Ser)_3$ ist für Bacillus subtilis toxisch, ergibt jedoch mit $(Ala)_3$ bei desem Organismus einen kompetitiven Antagonismus. Unterschiedliche Aufhebungsmuster ergaben sich in Kreuztests mit $(Lys)_3$ und $(Gly)_3$. Kreuztests mit Glutathion ergaben keine Beeinflussung der PTC-$(Ala)_2$-Aktivität.

Im Gegensatz zu den Resultaten mit den anderen Stämmen wurde die PTC-$(Ala)_2$-Wirkung gegen Salmonella minnesota durch $(Ala)_2$ und $(Lys)_2$ aufgehoben. Dieser Stamm wird später (3.2.2.1.) näher untersucht.

Die anderen untersuchten Stämme waren unempfindlich gegen die zur Verfügung stehenden toxischen Tripeptide.

Tab. 5: Empfindlichkeit verschiedener Mikroorganismen gegen L-Phosphinothricyl-alanyl-alanin im Plattendiffusionstest.
( ): inkomplette Hemmung;
Sp : spurweise Hemmung;
- : keine Hemmung

Organismus	Temp. (°C)	Medium	Hemmhofdurchmesser (mm) PTC-$(Ala)_2$ (mM)		
			0,1	0,01	0,001
Bakterien					
Eubacteriales					
Gram-negativ					
Achromobacter geminiani	27	M III	(15)	(11)	Sp
Agrobacterium tumefaciens	27	M III	-	-	-
Erwinia amylovora	27	M III	24	20	14
Erwinia carotovora	27	M III	18	12	Sp
Escherichia coli K-12 W 1485	37	M III	35	25	19
Proteus vulgaris	37	M III	28	22	17
Salmonella minnesota	37	M III	23	20	15
Salmonella typhimumium	37	M III	21	17	10
Xanthomonas campestris	27	M III	-	-	-
Eubacteriales					
Gram-positiv					
Bacillus brevis	37	M III	-	-	-
Bacillis subtilis	37	M III	42	30	19
Corynebacterium rathayi	27	M III	(15)	Sp	-
Staphylococcus aureus	37	M II	Sp	-	-

Tab. 5: Fortsetzung

Organismus	Temp. (°C)	Medium	Hemmhofdurchmesser (mm) PTC-$(Ala)_2$ (mM)		
			0,1	0,01	0,001
Pseudomonales					
Pseudomonas fluorescens	27	M III	Sp	-	-
Pseudomonas lachrymans	27	M III	Sp	-	-
Pseudomonas syringae	27	M III	17	11	8
Actinomycetales					
Mycobacterium phlei	27	M III	-	-	-
Streptomyces violaceoruber	37	M III	35	(15)	Sp
Streptomyces viridochromogenes	37	M III	(35)	(25)	Sp
Pilze					
Ascomycetes und Deuteromycetes					
Candida albicans	27	M III	-	-	-
Saccharomyces cerevisiae	27	M III	-	-	-
Botrytis cinerea	24	M IV	-	-	-
Colletrichum trifolii	27	M IV	-	-	-
Fusarium oxyxporum	27	M IV	Sp	-	-
Neurospora crassa	27	M IV	-	-	-
Paecilomyces varioti	27	M IV	-	-	-
Thielavopsis basicola	27	M IV	-	-	-

Tab. 5: Fortsetzung

Organismus	Temp. (°C)	Medium	Hemmhofdurchmesser (mm) PTC-$(Ala)_2$ (mM) 0,1	0,01	0,001
Basidiomycetes					
Rhizoctonia solani	27	M IV	26	18	14
Rhodotorula spec.	27	M IV	-	-	-
Ustilago maydis	27	M IV	-	-	-
Oomycetes					
Phytium debaryanum	27	M IV	28	22	17
Saprolegnia asterophora	20	M IV	-	-	-
Zygomycetes					
Mucor hiemalis	20	M IV	-	-	-
Mucor miehei	37	M IV	-	-	-

Tab. 6: Kreuztests mit PTC-$(Ala)_2$ und verschiedenen Peptiden.
Konzentration des PTC-$(Ala)_2$: 0,1 mM;
Konzentration der Peptide: 50 mM;
k : kompetitiver Antagonismus;
(k): schwacher Antagonismus;
- : kein Antagonismus;
Ø : Eigenhemmung.

Organismen	Peptide							
	$(Ala)_2$	$(Ala)_3$	$(Ala)_5$	$(Gly)_3$	$(Lys)_2$	$(Lys)_3$	$(Ser)_3$	Glutathion
Bacillus subtilis	-	k	k	(k)	-	-	Ø	-
Erwinia amylovora	-	k	k	k	-	k	k	-
Erwinia carotovora	-	k	k	k	-	k	k	-
Proteus vulgaris	-	k	k	(k)	-	(k)	k	-
Pseudomonas syringae	-	k	k	k	-	(k)	k	-
Salmonella minnesota	(k)	k	k	k	(k)	k	k	-
Salmonella typhimurium	-	k	k	(k)	-	k	k	-

3.2.2. Transport weiterer Peptid-Antibiotika

3.2.2.1. Fumarylcarboxyamido-L-2,3-diamino-propionyl-L-alanin (AL 9009)

Das von MOLLOY et al. (1972) aus Kulturen von Streptomyces collinus, Lindenbein isolierte Dipeptid-Antibiotikum ist ein Antagonist von D-Glucosamin und N-Acetyl-Glucosamin. Der molekulare Wirkungsmechanismus ist noch ungeklärt. Die Struktur des Moleküls ließ einen Transport in der Bakterienzelle über ein dem OPT verwandtes Transportsystem vermuten.

Das Dipeptid zeigte keine antibiotische Aktivität gegen Escherichia coli K-12, Bacillus subtillis und Bacillus brevis. (AL 9009) zeigte aber eine wenn auch schwache Beeinflussung der PTC-$(Ala)_2$ Wirkung gegen Escherichia coli K-12. Die Hemmung dieses Testkeimes durch das synthetische Dipeptid Alaphosphin (ALLEN et al. 1978) wird durch AL 9009 bei einem molaren Konzentrationsverhältnis von 1:100 kompetitiv, aber inkomplett antagonisiert.

Salmonella minnesota ist sensitiv gegen AL 9009. In Kreuztests zeigte dieses Dipeptid einen kompetitiven Antagonismus mit $(Ala)_2$, Ala-Gly, $(Ala)_3$, $(Ala)_5$, $(Ser)_3$, $(Gly)_3$ und $(Lys)_3$. Die Aufhebung durch die Dipeptde war dabei nur schwächer ausgeprägt als durch die Tripeptide. Die Konzentration des Antibiotikums betrug in diesen Versuchen 10 mM, die Konzentration der Peptide 50 mM. Glutathion hatte keinen Effekt auf die Hemmwirkung des AL 9009.

Salmonella minnesota scheint ein gemeinsames Transportsytem für Di- und Tripeptide zu besitzen.

3.2.2.2. Polyoxin, Nikkomycin

Polyoxine, Hemmstoffe der Chitinsynthese bei Pilzen, (SUHADOLNIK, 1970) können als Dipeptide mit Nucleosid-Bausteinen in der Seitenkette angesehen werden. Es wurde daher die Möglichkeit der Aufnahme dieser Substanzen über ein Peptid-Transport-System in Pilzzellen untersucht.

Als Testorganismus diente Mucor hiemalis. Im Kreuztest ließ sich Polyoxin B durch die Peptide Ala-Val, $(Ala)_2$ und $(Ala)_3$ antagonisieren (Tab.7). Das Bild der Aufhebung entsprach dem eines kompetitiven Antagonismus. Eine schwache Aufhebung bewirkten die Dipeptide Ala-Gly und Gly-Ala, $(Gly)_3$ zeigte keinen Einfluß auf die Polyoxin-Wirkung.

Tab. 7: Aufhebung der Polyoxin B-Wirkung durch verschiedene Peptide im Kreuztest.
Testorganismus: Mucor hiemalis;
k: kompetitiver Antagonismus;
-: kein Antagonismus.

Peptide (100 mM)	Polyoxin B (2 mM)
Ala-Gly	(k)
Gly-Ala	(k)
Ala-Val	k
$(Ala)_2$	k
$(Ala)_3$	k
$(Gly)_3$	-

Analog zu diesen Versuchen wurden Untersuchungen mit dem Nucleosid-Antibiotikum Nikkomycin (HÖHNE, 1974) durchgeführt. Nikkomycin ist strukturell verwandt mit den Polyoxinen und ebenfalls ein Hemmstoff der Chitinsynthese bei Pilzen (DÄHN et al. 1976). Die antifungische Wirkung des Antibiotikums ließ sich ebenfalls duch $(Ala)_2$ und $(Ala)_3$ kompetitiv aufheben. Auf Escherichia coli als Testorganismus vermochten weder Polyoxin B noch Nikkomycin die antibakterielle Wirkung von PTC-$(Ala)_2$ oder Alaposphin aufzuheben.

3.3. TRANSPORT VON METHIONINSULFON UND L-METHIONINSULFONYL-ALANYL-ALANIN

Die Kenntnis der Strukturspezifität des OPT-Sytems war die Grundlage für folgende Versuche: Methioninsulfon (MSO), ein Hemmstoff der Glutaminsynthetase, wurde durch kovalente Bindung an einen Alanyl-alanin-Rest in ein Tripeptid überführt, welches den strukturellen Anforderungen des OPT-Systems genügt (DIDDENS et al.,1976).

3.3.1. Kompetitionsversuche

Der Beweis für eine Aufnahme der Tripeptids MSO-$(Ala)_2$ in Zellen von Escherichia coli K-12 und Bacillus subtilis über das OPT-System wurde analog zu den Arbeiten mit den Tripeptid-Antibiotika geführt. MSO-$(Ala)_2$ zeigte in Kreuztests mit Peptiden das gleiche Aufhebungsmuster wie die Peptid-Antibiotika (Tab. 8). Die MSO-Wirkung blieb durch die Peptide unbeeinflußt.

Tab. 8: Vergleich der Aufhebungsmuster von PTC-$(Ala)_2$ und MSO-$(Ala)_2$ durch verschiedene Peptide im Kreuztest.
k : kompetitiver Antagonismus;
++: nicht kompetitiver Antagonismus;
(k): schwacher Antagonismus;
- : kein Antagonismus.

Peptide	Organismen			
	Bacillus subtilis		Escherichia coli	
(5 mM)	PTC $(Ala)_2$ (0,01 mM)	MSO-$(Ala)_2$ (1 mM)	PTC-$(Ala)_2$ (0,01 mM)	MSO-$(Ala)_2$ (50 mM)
$(Ala)_2$	-	-	-	-
$(Ala)_3$	k	k	k	k
$(Ala)_5$	k	k	k	k
$(Gly)_3$	(k)	(k)	k	k
$(Gly)_2$-Ala	k	k	k	k
Gly-$(Phe)_2$	k	k	++	++
$(Lys)_2$	-	-	-	-
$(Lys)_3$	-	-	k	k
Glutathion	-	-	-	-

Nach Zugabe von 0,1 mM Methionin in das Medium zeigte MSO bis zu einer Konzentration von 50 mM keine Wirkung mehr gegen die Testorganismen Escherichia coli K-12 und Bacillus subtilis, MSO-$(Ala)_2$ behielt seine volle Aktivität auf diesem Medium. Im Kreuztest hob Methionin bei beiden Organismen die MSO-Hemmung kompetitiv auf, während die Aktivität des Tripeptides unbeeinflußt blieb. Die Kompetition zwischen Methionin und MSO liegt also eindeutig auf dieser Ebene des Transportes.

Die Wirkung beider Hemmstoffe ließ sich im Kreuztest durch Glutamin aufheben. Dieser Antagonismus bezieht sich auf den Wirkort (RONZIO et al., 1969).

3.3.2. Untersuchungen an L-Phosphinothricyl-alanyl-alanin - resistenten Mutanten

Von Bacillus subtilis wurden PTC-$(Ala)_2$-resistente Mutanten isoliert. Diese Mutanten (Bs PR) zeigten Kreuzresistenz mit den Tripeptid-Antibiotika PMS-$(Ala)_2$ und Plumbemycin B, blieben jedoch sensitiv gegen MSO-$(Ala)_2$ (Tab.9). Da die Hemmung der Mutanten durch das MSO-$(Ala)_2$ in Kreuztests mit $(Ala)_2$ und (Met_3) kompetitiv aufgehoben werden konnte, ist ein Defekt im Transport-System auszuschließen. Wahrscheinlich ist bei der Mutante eine Peptidase verändert oder fehlt ganz, denn zumindest die Antibiotika PTC-$(Ala)_2$ und PMS-$(Ala)_2$ müssen im Zellinnern von ihren Peptid-Vehikeln abgespalten werden, um antibakteriell wirksam werden zu können (BAYER et al., 1972; PRUESS et al., 1973). MSO-$(Ala)_2$ hat entweder eine andere Spezifität für Peptidasen, oder die Substanz muß, um eine Hemmung auf die Glutamin-Synthetase ausüben zu können, nicht gespalten werden. Dieses würde auch die Sensitivität der PR II Mutante von Escherichia coli K-12 gegen MSO-$(Ala)_2$ erklären.

Tab. 9: Empfindlichkeit PTC-$(Ala)_2$-resistenter Mutanten von Escherichia coli K-12 und Bacillus subtilis gegen verschiedene Hemmstoffe im Plattendiffusionstest.
( ): inkomplette Hemmung;
- : keine Hemmung;
WT : Wildtyp.

Hemmstoff	Konz. (mM)	Hemmhofdurchmesser (mm) E.coli WT	PR I	PR II	B.subtilis WT	Bs PR
PTC-$(Ala)_2$	0,1	36	-	-	45	-
PMS-$(Ala)_2$	0,5	29	-	-	25	-
Plumbemycin B	2,0	31	-	-	29	-
$(Orn)_3$	20,0	22	-	18	-	-
MSO	50,0	(17)	(17)	(19)	36	39
	25,0	(13)	(13)	(14)	35	36
	10,0	(12)	(12)	(13)	32	33
MSO-$(Ala)_2$	50,0	19	-	13	34	30
	25,0	15	-	12	31	28
	10,0	14	-	(9)	28	26

3.3.3. Vergleich der minimalen Hemmkonzentration

Die antibakterielle Aktivität des MSO konnte durch die Bindung an einen Alanyl-alanin-Rest nicht gesteigert werden. Im Verdünnungsreihentest zeigten die beiden Substanzen gleiche minimale Hemmkonzentrationen. Für Escherichia coli K-12 lag die MHK in beiden Fällen bei einer Hemmstoff-Konzentration von 20 µM. Bei Versuchen mit Bacillus subtilis im Verdünnungsreihentest lagen die Werte für die MHK bei einer Konzentration von je 2,5 µM.

Biophotometerversuche mit vegetativen Zellen von Bacillus subtilis ergaben ebenfalls eine Übereinstimmung der MHK-Werte für MSO und MSO-$(Ala)_2$. In Abbildung 10 ist das Ausmaß der Wachstumshemmung dargestellt. Es wurde die zeitliche Verzögerung der lag-Phase gegenüber dem Kontrollansatz aufgetragen.

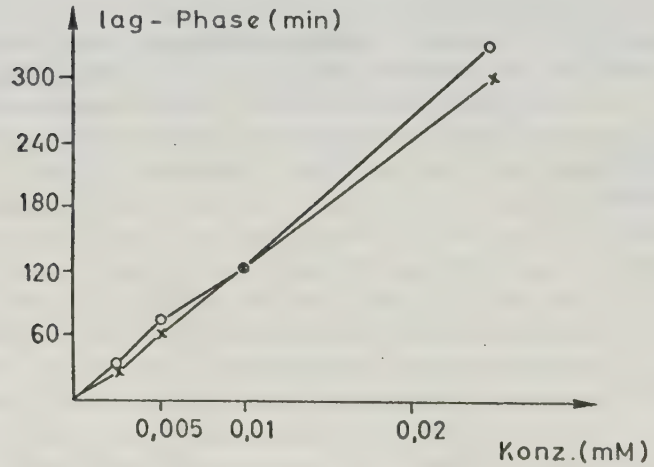


Abb. 10: Vergleich der antibakteriellen Aktivität von MSO und MSO-$(Ala)_2$ im Biophotometer.
Testorganismus: Bacillus subtilis
Die Verzögerung der lag-Phase ist gegen die Konzentration aufgetragen.
o: MSO;
x: MSO-$(Ala)_2$.
Die Zugabe der Hemmstoffe erfolgte bei einer Transmission von 90%.

3.3.4. Kombinationsversuche mit Methioninsulfon und L-Methioninsulfonyl-alanyl-alanin

Die gleichzeitige Gabe von MSO und MSO-$(Ala)_2$ im Kreuztest ergab bei Escherichia coli einen Synerismus. Ein solcher Kreuztest ist in Abb. 11 dargestellt. Ein ähnlicher Effekt konnte bei Bacillus subtilis festgestellt werden.

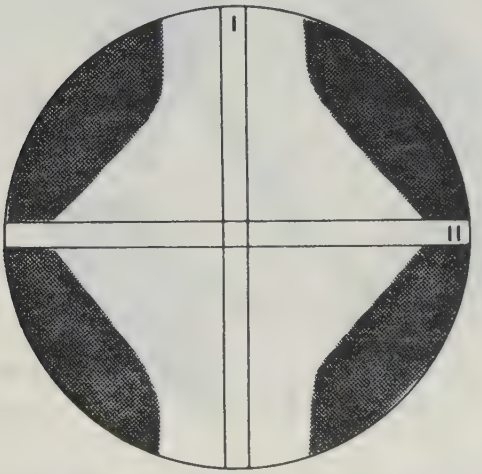


Abb. 11: Synergetischer Effekt zwischen MSO-$(Ala)_2$ und MSO im Kreuztest.
Testorganismus: Escherichia coli K-12;
Filterstreifen I: 50 mM MSO-$(Ala)_2$;
Filterstreifen II: 50 mM MSO.

In Biophotometerversuchen mit Bacillus subtilis konnte bei Kombination der Hemmstoffe jedoch nur ein additiver Effekt festgestellt werden (Abb. 12). Es wurden außerdem Plattendiffusionstests durchgeführt, in denen Kombinationen verschiedener Konzentrationen der beiden Stoffe untersucht wurden. Auch diese Ergebnisse zeigten nur einen additiven Effekt an.

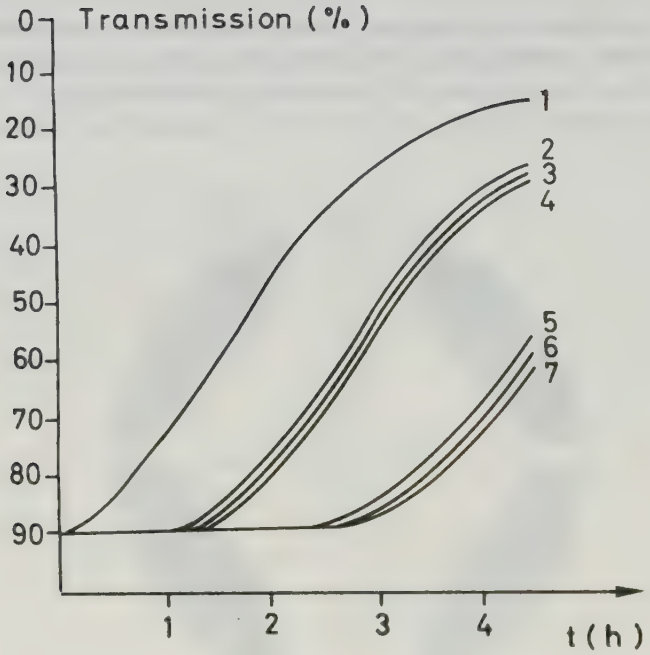


Abb. 12: Kombinationsversuch mit MSO und MSO-$(Ala)_2$ im Biophotometer.
Testorganismus: Bacillus subtilis
1: Kontrolle
2: 0,005 mM MSO-$(Ala)_2$
3: 0,0025 mM MSO-$(Ala)_2$ + 0,0025 mM MSO
4: 0,005 mM MSO
5: 0,01 mM MSO-$(Ala)_2$
6: 0,05 mM MSO-$(Ala)_2$ + 0,005 mM MSO
7: 0,01 mM MSO
Die Zugabe der Hemmstoffe erfolgte bei einer Transmission von 90%

Kreuztests mit Alanin resp. $(Ala)_3$ in hohen Konzentrationen erbrachten ebenfalls eine Verstärkung der MSO-Wirkung (Abb. 13). Diese Wirkungssteigerung war bei Escherichia coli etwas stärker ausgeprägt als bei Bacillus subtilis.

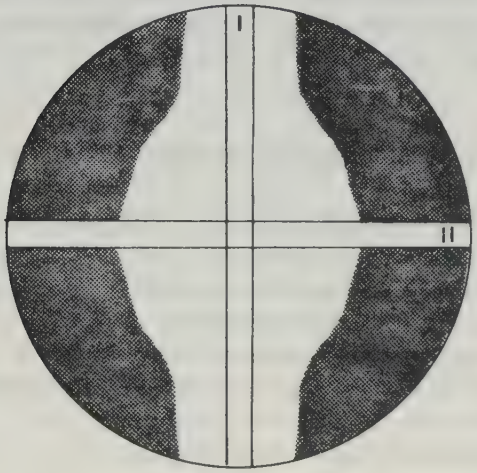


Abb. 13: Verstärkung der Hemmwirkung des MSO durch $(Ala)_3$ im Kreuztest.
Testorganismus: Escherichia coli K-12;
Filterstreifen I: 50 mM MSO;
Filterstreifen II: 50 mM $(Ala)_3$.

Die Steigerung der Hemmwirkung kann demnach zusätzlich durch die erhöhte Menge an Alanin im Zellinnern bedingt sein.

3.4. UNTERSUCHUNG SEMISYNTHETISCHER SIDEROMYCINE

Unter Ausnutzung der Kenntnisse über Siderochrom-Transport-Systeme bei Mikroorganismen wurde die Verwendbarkeit von Sideraminen als Vehikel für antibakteriell wirksame Substanzen geprüft. Hierfür wurden eine Reihe semisynthetischer Sideromycin-Derivate (vgl. Abb. 3 a,b) synthetisiert (NAEGELI, 1978) und auf ihre antibakterielle Aktivität und ihr Transportverhalten untersucht.

Folgende Substanzen wurden untersucht:

Sulfonamid-Sideramin-Derivate

I : 6-Sulfanilamido-nicotinsäure-ferricrocinylester
II : N-Sulfaninyl-ferrioxamin B
III : N-(Sulfaninyl-carbamoyl)-ferrioxamin B
IV : N-(6-Sulfanilamido-nicotinoyl)-ferrioxamin B

Sulfanilamid als Vergleichssubstanz

Nalidixinsäure-Sideramin-Derivate:

V : Nalidixinsäure-ferricrocinylester
VI : 4-Nalidixinoylamino-nicotinsäure-ferricrocinylester
VII : N-Nalidixinoyl-ferrioxamin B
VIII : N-(4-Nalidixinoylamino-nicotinoyl)-ferrioxamin B

Nalidixinsäure als Vergleichssubstanz

Acylierte Sideramin-Derivate:

IX : N-p-Aethoxyphenyl-acetyl-ferrioxamin B
X : N-p-Chlorphenylacetyl-ferrioxamin B

ferner:

XI : O-(Pyridyl-3-carbamoyl)-desferriferricrocin

Zur Aktivitätsbestimmung wurde das Desferriferricrocin-Derivat mit einer äquimolaren Menge $FeCl_3$ in den Eisenkomplex überführt.

Natürliche Sideromycine:

Albomycin, A22765, Ferrimycin

3.4.1. Bestimmung antibakterieller Aktivität

Die antibakterielle Aktivität der oben aufgeführten Substanzen gegen die Testorganismen Escherichia coli K-12, Bacillus subtilis und Staphylococcus aureus wurde im Plattendiffusionstest bestimmt. Die Ferricrocin-Derivate V, VI und XI und die Ferrioxamin B-Derivate II, III, VII, VIII, IX und X waren bis zu einer Konzentration von 2 mg/ml nicht wirksam. Die Ergebnisse mit den wirksamen Substanzen sind in Tab. 10 zusammengefaßt.

PUGSLEY and REEVES (1976) haben gezeigt, daß die Eisenkonzentration bei der Anzucht der Zellen von Escherichia coli K-12 einen Einfluß auf die Synthese des Ferrichrom-Rezeptors, das tonA-Genprodukt, in der äußeren Membran hat. Da Escherichia coli auf M I praktisch keine Sensitivität gegen das Ferricrocin-Derivat I zeigte, wurde der Testorganismus über mehrere Generationen unter Eisenmangel kultiviert. Die Anfertigung der Testplatten ist im Methodenteil beschrieben. Derart vorbehandelte Zellen waren sensitiv gegen I. Sie sind in Tabelle 10 als E. coli-Fe aufgeführt.

TonA-Mutanten von Escherichia coli K-12 waren unter gleichen Kulturbedingungen resistent gegen alle untersuchten Sideromycine. Die Sensitivität einer feuB-Mutante von Escherichia coli K-12 war mit der des Wildtyps vergleichbar.

Tab. 10: Bestimmung der antibakteriellen Aktivität semisynthetischer Sideromycine im Plattendiffusionstest.
I : 6-Sulfanilamido-nicotinsäure-ferricrocinylester;
II : N-(6-Sulfanilamido-nicotinoyl)-ferrioxamin B;
( ) : inkomplette Hemmung;
Sp. : spurweise Hemmung;
- : keine Hemmung.

Hemmstoffe	Konz. mg/ml	E.coli	E.coli-Fe	B.subt.	S.aureus
semisynthet. Sideromycine:					
I	1,0	-	27	-	38
	0,3	-	23	-	30
	0,1	-	18	-	18
IV	1,0	-	-	-	(25)
	0,3	-	-	-	(23)
	0,1	-	-	-	(21)
Vergleichs-substanzen:					
Albomycin	1,0	25	26	23	26
	0,3	20	21	19	20
	0,1	17	17	17	14
Sulfanilamid	1,0	25	27	(36)	12
	0,3	20	20	(30)	Sp
	0,1	12	15	(20)	Sp

3.4.2. Kompetitionsversuche

In Kreuztests mit natürlichen Sideromycinen wurde bei allen Organismen die antibiotische Wirkung von Albomycin von jedem der untersuchten nicht aktiven Sideramin-Derivaten kompetitiv aufgehoben. Bei Bacillus subtilis und Staphylococcus aureus zeigten die Derivate ebenfalls einen kompetitiven Antagonismus mit dem Antibiotikum A 22765, das der Ferrioxamin B-Reihe zuzuordnen ist. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß der Sideramin-Charakter der Derivate beibehalten wurde.

Als Nachweis für den Sideromycin-Charakter der Substanzen I und IV wurden Antagonismustests mit Sideraminen durchgeführt. Das Sulfonamid-Ferricrocin-Derivat zeigte in Kreuztests mit Escherichia coli K-12-Fe einen kompetitiven Antagonismus mit Ferricrocin. Das Konzentrationsverhältnis des Sideromycins zum Sideramin von 2:1 entspricht dem Inhibitions-Index nach WOOLEY (1952). Wie erwartet, blieb die Aktivität durch Ferrioxamin B unbeeinflußt.

Bei Staphylococcus aureus als Testorganismus konnte die Hemmwirkung beider semisynthetischer Sideromycin-Derivate sowohl durch Ferricrocin als auch durch Ferrioxamin B kompetitiv aufgehoben werden. In Abbildung 14 ist der kompetitive Antagonismus zwischen dem semisynthetischen Sideromycin I und den Sideraminen Ferricrocin und Ferrioxamin dargestellt. Auch hier konnte ein Inhibitions-Index von 2:1 (Sideromycin : Sideramin) festgestellt werden. Das Aufhebungsmuster im Kreuztest mit p-Aminobenzoesäure (Abb.15) zeigte eine komplette Aufhebung der Aktivität des Sulfonamid-Sideramin-Derivates I. Dieses Bild war sowohl bei Escherichia coli als auch bei Staphylococcus aureus zu beobachten.

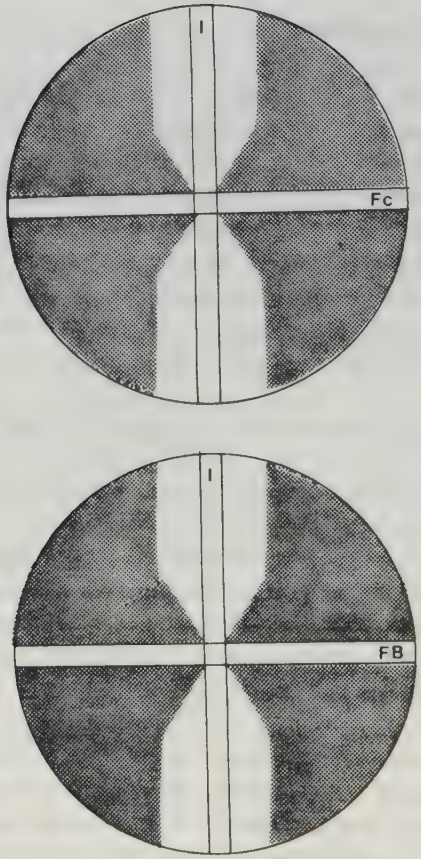


Abb. 14: Kompetitiver Antagonismus zwischen
I: 6-Sulfanilamido-nicotinsäure-ferricrocinylester und den Sideraminen
Fc: Ferricrocin und
FB: Ferrioxamin B im Kreuztest.
Testorganismus: Staphylococcus aureus;
Konzentration des semisynthetischen
Sideromycins: 1 mM;
Konzentration der Sideramine: 0,5 mM.

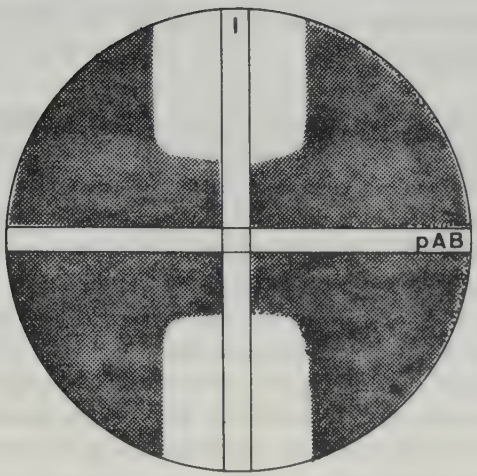


Abb. 15: Komplette Aufhebung des Sulfanomid-Derivates
I : 6-Sulfanilamido-nicotinsaure-ferricrocinyl-ester durch
pAB: p-Aminobenzoesäure
Testorganismus: Staphylococcus aureus;
Konzentration der Substanzen: je 1 mM

Identische Bilder ergaben Kreuztests auf Staphylococcus aureus mit der Substanz IV. Diese Ergebnisse beweisen, daß die Sideramin-Sulfonamid-Derivate in der Zelle als Sulfonamide wirksam sind.

Kreuztests mit Sulfanilamid und p-Aminobenzoesäure ergaben das Bild eines kompetitiven Antagonismus. Mit Sulfonamid und den Sulfonamid-Sidermycin-Derivaten stehen, analog zu dem Substanzenpaar MSO und MSO-$(Ala)_2$, Hemmstoffe zur Verfügung, die über zwei verschiedene

Wege in die Zelle gelangen. Kombinationsversuche in Kreuztests mit Sulfanilamid und den Sideramin-Derivaten ergaben jedoch nur einen additiven Effekt der Wirksamkeit der Substanzen.

3.4.3. Isolierung und Charakterisierung Albomycin-resistenter Mutanten von Staphylococcus aureus

Wie im Methodenteil beschrieben, wurden Albomycin-resistente Spontan-Mutanten von Staphylococcus aureus isoliert. Diese Mutanten zeigten Kreuzresistenz mit den Sideraminen A 22765 und Ferrimycin und den Sulfonamid-Sideramin-Derivaten. Die Mutanten waren weiterhin empfindlich gegen Sulfanilamid. Diese Ergebnisse lassen auf einen Defekt im Aufnahmesystem schließen, dessen Spezifität Sidermycine des Ferricrocin- und des Ferrioxamin B-Typs einschließt.

3.4.4. Vergleich der minimalen Hemmkonzentrationen

Im Verdünnungsreihentest wurde die MHK des Sulfanilamids und die des Sulfonamid-Ferricrocin-Derivates bestimmt. Die Versuche wurden wie im Methodenteil beschrieben mit Staphylococcus aureus durchgeführt. Die MHK für Sulfanilamid lag bei einer Konzentration von 50 µM. Für das Sideramin-Derivat wurde ein MHK-Wert von 0,05 µM ermittelt. Ein Vergleich der MHK-Werte ergab damit für das semisynthetische Sidermycin eine Wirkungssteigerung gegenüber der Ausgangssubstanz um einen Faktor 1000.

4. D I S K U S S I O N

Peptid-Transport

Die vorliegenden Untersuchungen dienten zunächst dem Nachweis, daß die Tripeptid-Antibiotika L-Phosphinothricyl-alanyl-alanin, L-(N^5-Phosphono)methionin-S-sulfoximinyl-alanyl-alanin und Plumbemycin B (Abb. 2, I-III) über das Oligopeptid-Transportsystem transportiert werden. Die Übereinstimmung der Strukturen dieser Antibiotika mit den strukturellen Anforderungen des OPT-Systems (Abb. 1) machte diese Annahme sehr wahrscheinlich. Tatsächlich konnte durch die Ergebnisse der Antagonismustests und die Kreuzresistenz zwischen den Antibiotika und $(Orn)_3$ eine Aufnahme dieser Tripeptid-Antibiotika über das OPT-System von Escherichia coli K-12 bewiesen werden.

Zur weiteren Klärung der Spezifität des OPT-Systems wurde untersucht, ob unter der Vielzahl der heute beschriebenen Antibiotika noch andere über das OPT-System aufgenommen werden, obwohl deren strukturelle Übereinstimmung mit der Spezifität dieses Systems nicht sofort erkennbar ist. Hierzu wurde die Aktivität verschiedenster Antibiotika im Plattendiffusionstest gegen Escherichia coli K-12 und der OPT-Transport-Mutante PR I untersucht.

Lediglich bei dem Tripeptid-Antibiotikum Alazopeptin (PATTERSON et al., 1966) war ein signifikanter Unterschied in der Wirkungsintensität festzustellen (Tab. 4). Obwohl das Alazopeptin den strukturellen Anforderungen des OPT-Systems entspricht, ließ sich die antibakterielle Wirkung auch durch hohe Peptid-Konzentra-

tionen nur schwach antagonisieren. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Verbindung so labil ist, daß in der untersuchten Lösung ein Gemisch aus dem Tripeptid Alazopeptin (Ala-DON-DON), dem Dipeptid Ala-DON und der freien Aminosäure DON vorlag. Eine solche Zusammensetzung könnte einerseits die Differenz in der Wirkungsintensität gegenüber Wildtyp und OPT-Mutante erklären, falls als Hauptkomponente das Tripeptid vorliegt, andererseits wäre die geringe Kompetition durch Peptide verständlich. Alle anderen untersuchten Antibiotika zeigten keinen Unterschied in ihrer antibakteriellen Wirkung gegen den Wildtyp und die Transport-Mutante, sie werden also nicht über das OPT-System transportiert.

Es wurde nun versucht, synthetische Hemmstoffe an Peptide zu knüpfen, um sie auf diese Weise über das OPT-System in die Zelle zu schleusen.

Als erste Substanz wurde das synthetische Methioninsulfon (MSO) in das Tripeptid MSO-$(Ala)_2$ überführt. Während das freie MSO den Transportweg für Methionin benutzt (KADNER, 1975, 1977), konnte für das MSO-$(Ala)_2$ gezeigt werden, daß es über das OPT-System transportiert wird. Die Wirkstoffe gelangen also über zwei verschiedene Wege in die Zelle. Beide hemmen aber in spezifischer Weise die Glutamin-Synthetase. Sowohl für die Transportwege als auch für den Wirkort sind spezifische Inhibitoren vorhanden. Damit hatten wir ein erstes Modell für Kombinationsversuche mit Hemmstoffen, die den gleichen Wirkort aufweisen, aber durch chemische Modifizierung verschiedene Transportwege benutzen. Bei gleichzeitiger Gabe von MSO und MSO-$(Ala)_2$ war im Kreuztest ein synergistischer Effekt zu beobachten. Dieser Synergismus konnte jedoch bei genauerer Untersuchung mit verschiedenen Kombinationen beider Substanzen weder im Plattendiffusionstest noch in Biometerversuchen bestätigt

werden. In jedem Fall war ein additiver Effekt durch die beiden Substanzen zu verzeichnen. Es besteht die Möglichkeit, daß das Bild einer synergistischen Wirkung der Substanzen im Kreuztest durch die zusätzliche Menge an Alanin, das im Zellinneren durch Peptidasen von dem Peptid abgespalten wird, hervorgerufen werden kann. Hohe Dosen an Alanin können in einer kumulativen Feedback-Inhibition die Glutaminsynthetase hemmen (WOOLFOLK und STADTMAN, 1967; SHAPIRO und STADTMAN, 1970; ADLER et al., 1975). Dieses Phänomen ist in dem oben beschriebenen Modell nicht gegen einen echten Synergismus abgrenzbar. Eine Bestätigung dieser Hypothese lieferte die Tatsache, daß im Kreuztest mit MSO und hohen Alanin-Konzentrationen ebenfalls eine Wirkungssteigerung des MSO erreicht werden konnte. Prinzipiell sollte ein synergistischer Effekt möglich sein, wenn der Transport der limitierende Faktor für die Effektivität des Hemmstoffes ist.

Die ungewöhnliche heterocyclische Aminosäure Azaadenyl-aminohexansäure (AZA) zeigte keinerlei antibakterielle Wirkung gegen verschiedene Testorganismen. Dieses könnte darauf zurückzuführen sein, daß die Substanz nicht in genügendem Maße in die Bakterienzellen eindringen kann. Es wurde daher auch mit dieser Verbindung versucht, sie in ein Tripeptid zu überführen. Den Strukturanforderungen des OPT entsprechend, wurde das AZA kovalent an einen Alanyl-alanin-Rest gebunden (KRAAS, 1975). Das so entstandene Tripeptid war jedoch ebenfalls inaktiv gegen die untersuchten Organismen. In Kreuztests konnte jedoch eine kompetitive Aufhebung der antibiotischen Wirkung aller OPT-transportierten Hemmstoffe beobachtet werden, was zumindest auf eine Konkurrenz um die Bindungsstelle der OPT-Permease hinweist. (Die Bearbeitung dieses Stoffes ist im Ergebnisteil nicht aufgeführt).

Weitere Untersuchungen mit Synthetika, die nach Kopplung an ein kurzes Peptid über das OPT-System in die Zellen transportiert werden sollten, wurden mit dem Antituberkulotikum Isoniazid (INH) und dem entsprechenden Tripeptid-Derivat $(Ala)_3$-INH durchgeführt. INH inaktiviert den Inhibitor der NADase bei Mycobacterium tuberculosis. Die Toxizität der Verbindung ergibt sich aus der Erhöhung der NADase-Aktivität. Eine Resistenz der Bakterien wird von einer Veränderung der Zellwandpermeabilität für das Antituberkulotikum begleitet (SRIPRAKASH und RAMAKRISHNAN, 1970). Eine Bindung des INH an ein Peptid könnte dieses Resistenz-Problem umgehen, vorausgesetzt, Mycobacterium tuberculosis verfügt über ein entsprechend unspezifisches Peptid-Transportsystem. Die Schwierigkeit bei der Untersuchung der INH-Derivate lag in der Auswahl eines geeigneten Testkeimes, da INH spezifisch gegen Mycobacterium tuberculosis wirkt. Weder INH noch das Tripeptid zeigten eine Aktivität gegen die in Tabelle 5 aufgeführten Mikroorganismen. Die Bearbeitung der Substanzen scheiterte an dem Versuch, einen apathogenen Stamm von Mycobacterium tuberculosis in Minimalmedium ohne Peptide in Submerskultur zu züchten. Vielversprechender wäre in diesem Fall, INH an ein Mycobactin, dem spezifischen Eisenkomplexbildner für Mycobacterien zu koppeln. Mycobactine sind Dihydroxamat-Verbindungen, die als Wachstumsfaktoren nur von Mycobacterien synthetisiert werden (SNOW, 1970).

Die Verbreitung des OPT-Systems bei Mikroorganismen wurde mit einer Reihe von Testkeimen untersucht (Tab. 5). Bei der Auswahl wurden phytopathogene und medizinisch interessante Organismen besonders berücksichtigt. Keime, bei denen eine Hemmung durch PTC-$(ALA)_2$ gefunden wurde, wurden in Kreuztests mit PTC-$Ala)_2$ und Peptiden weiter untersucht. Die antibiotische Aktivität des PTC-$(Ala)_2$ ließ sich sowohl bei

den Pilzen Phytium debaryanum und Rhizoctonia solani als auch bei den Streptomyceten Streptomyces violaceoruber und Streptomyces viridochromogenes nur sehr schwach durch Peptide aufheben. Eine Erklärungsmöglichkeit ist, daß diese Organismen Peptidasen ausscheiden und freies PTC aufnehmen können. Die anderen PTC-$(Ala)_2$-sensitiven Stämme zeigten in Kreuztests mit Di- und Tripeptiden unterschiedliche Aufhebungsmuster. Möglicherweise werden Peptide, die PTC-$(Ala)_2$ nicht antagonisieren, entweder durch extracelluläre Peptidasen gespalten, nicht über das gleiche Transportsystem in die Zelle aufgenommen oder gar nicht transportiert. Zur gezielten Entwicklung von Peptidhemmstoffen gegen solche Organismen ist eine weitere Klärung der Spezifität der Transportsysteme und der Proteaseaktivität eine notwendige Voraussetzung.

Unter den getesteten phytopathogenen Keimen konnte ein Peptid-Transportsystem bei folgenden Organismen nachgewiesen werden:

Erwinia amylovora, Erreger des Feuerbrandes bei Weißdorn und Obsthölzern, (einer der gefürchtetsten phytopathogenen Keime) (SCHMIDLE, 1977).

Erwinia carotovora, Erreger der Schwarzbeinigkeit und Knollennaßfäule der Kartoffel sowie der Naßfäule zahlreicher anderer Pflanzen (STAPP, 1958).

Pseudomonas syringae, Erreger der Fliederseuche und des Bakterienbrandes bei Obsthölzern (STAPP, 1958; SCHMIDLE, 1977).

Obwohl nur eine kleine Auswahl an phytopathogenen Mikroorganismen untersucht wurde, ist die Verbreitung von Peptid-Transportsystemen auffällig. Ein Einsatz von Hemmstoffen, gekoppelt an Peptid-Vehikel, scheint daher sehr vielversprechend.

Für den Pflanzenschutz wurden bisher vorwiegend Antibiotika untersucht und angewendet, die auch in der Medizin eingesetzt werden (KNÖSEL, 1969; LANGE, 1975), wie zum Beispiel Tetracycline (HUHTANEN und CONVERSE, 1971; IGWEBE und CALAVAN, 1973), Penicillin (WINDSOR und BLACK, 1973), und Streptomycin, das in den U.S.A. in Feldversuchen gegen Erwinia amylovora eingesetzt wird (BEUTEL et al., 1973). Die Anwendung dieser Antibiotika ist aus medizinischen Gründen nicht vertretbar, da die eingesetzten Mengen weit über den medizinisch angewendeten Dosen liegen müssen. Die Antibiotika werden zum Teil nicht schnell genug abgebaut, so daß sie mit den Pflanzen verzehrt werden und so neben einer Allergisierung von Menschen auch die Selektion episomaler Resistenz humanpathogener Keime bedingen können.

In bestimmten Fällen ist der speziesspezifische und damit gezielte Einsatz von Antibiotika an Stelle der üblichen globalen Spritzmittel dennoch sinnvoll. Bei der Auswahl der Stoffe ist es notwendig, nur solche Antibiotika zu wählen, die im klinischen Bereich keine Verwendung finden, die mit den in der Humanmedizin verwendeten Hemmstoffen keine Kreuzresistenz aufweisen, die relativ schnell abgebaut werden und nach klinisch ausreichenden Untersuchungen nicht toxisch sind. Substanzen, die diesen Kriterien entsprechen, könnten, gekoppelt an Peptide, selektiv gegen phytopathogene Keime eingesetzt werden, die ein Peptid-Transpostsystem besitzen. PTC-$(Ala)_2$ wurde unabhängig von GUGEL (1971) von KONDO et al., (1973) isoliert und von dieser Arbeitsgruppe als Fungizid patentiert.

Eine Anwendung des Zellwandhemmstoffes D-F-Alanin (KOLLONITSCH et al., 1973) in Kombination mit dem Tetrapeptid-Derivat $(Gly)_3$-D-F-Alanin wäre überlegenswert, da durch die Aufnahme über zwei unabhängige

Transportsysteme die Resistenzrate gegen den Hemmstoff herabgesetzt werden kann.

In diesem Rahmen ist ebenfalls interessant, daß auch bei freilebenden Nematoden eine Aufnahme von Di- und Tripeptiden beschrieben wurde (PINNOCK et al., 1975). Hieraus könnte sich eine neue Möglichkeit zur Bekämpfung pathogener Nematoden ergeben.

Die Untersuchung von Peptid-Transportsystemen bei Pilzen wurde mit Polyoxin B und Nikkomycin an Mucor hiemalis als Testorganismus durchgeführt. Die beiden Antibiotika sind strukturell verwandt, man kann sie als Dipeptidyl-pyrimidin-nucleoside bezeichnen. Beide Antibiotika hemmen spezifisch die Chitinsynthese von Pilzen (ENDO et al., 1970; HÖHNE, 1974; HORI et al., 1974 a,b,). MITANI und INOUE (1968) beschrieben die Aufhebung der antifungischen Aktivität einer Mischung der Polyoxine D, E und F gegen den Testorganismus Pellicularia sasakii durch verschiedene Aminosäuren und Dipeptide. Diese Untersuchungen und die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse lassen auf einen Transport der Nucleosid-Antibiotika über Peptid-Transportsysteme von Pilzen schließen. Dabei handelt es sich bei Mucor hiemalis offensichtlich um ein gemeinsames Transportsystem für Di- und Tripeptide, da eine Kompetition der Polyoxin-Wirkung und der Hemmung durch Nikkomycin sowohl durch Dipeptide als auch durch Tripeptide erzielt werden kann.

Der Peptid-Transport bei Pilzen wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. Diverse Tri-, Tetra- und Pentapeptide werden von Saccharomyces cerevisiae (NAIDER et al., 1974), Candida albicans (LICHLITER et al., 1976) und Neurospora crassa (WOLFINBARGER und MARZLUFF, 1975 a,b) transportiert. Während Neurospora crassa kein

Transportsystem für Dipeptide besitzt (WOLFINBARGER und MARZLUFF, 1974), wird bei den Hefen ein gemeinsames Transportsystem für Di- und Tripeptide angenommen (MARDER et al., 1977). Im Gegensatz zu Bakterien (PAYNE, 1974; CASCIERI und MALETTE, 1976; PAYNE und GILVARG, 1978), Neurospora crassa (WOLFINBARGER und MARZLUFF, 1975 b), und tierischen Zellen (RUBINO et al., 1971) können Hefen N-acetylierte Peptide transportieren (LICHLITER et al., 1976; BECKER und NAIDER, 1977). Peptide mit acetyliertem Aminoende werden von Candida albicans mit der gleichen Effektivität wie nicht acetylierte Peptide aufgenommen. Ebenso werden Peptide transportiert, deren erste Aminosäure ein D-Isomeres ist. Diese Unterschiede in der Strukturspezifität gegenüber den anderen Organismen bilden eine wertvolle Grundlage für die Entwicklung Peptid-transportierter Hemmstoffe mit einer selektiven Wirkung gegen Candida albicans. Ein wichtiges Anwendungsgebiet solcher Hemmstoffe ist die medizinische Behandlung systemischer Candida-Mycosen. Bei der Synthese entsprechender Verbindungen muß allerdings beachtet werden, daß Candida albicans keine lysinhaltigen Peptide aufnehmen kann und ein freies Carboxylende für einen Transport der Peptide notwendig ist (LICHLITER et al., 1976).Um einer frühzeitigen Spaltung des Peptides durch menschliche Hydrolasen zu umgehen, besteht die Möglichkeit, die terminale Carboxylfunktion durch einen Phosphonsäurerest zu ersetzen. Dieses Prinzip wurde am Beispiel des Alaphosphins geprüft (ALLEN et al., 1977, 1978). Eine endständige Phosphongruppe wird von dem DPT-System von Escherichia coli, dessen Spezifitätsanforderung ebenfalls ein freies Carboxylende einschließt, akzeptiert (DIDDENS et al., 1979). Daher ist zu vermuten, daß Candida albicans entsprechende Verbindungen aufnehmen kann.

Sideramin-Transport

Die Möglichkeit, Sideramine als Transport-Vehikel für Hemmstoffe zu benutzen, wurde untersucht, indem die Stoffe zunächst direkt an das Sideramin gekoppelt wurden. Diese Substanzen waren jedoch antibakteriell nicht wirksam. Wie sich in Kreuztests nachweisen ließ, behielten diese Verbindungen aber ihren Sideramin-charakter bei. Eine genaue Betrachtung der Struktur des natürlichen Sideromycins Ferrimycin A_1 (Abb. 3b) zeigt, daß der vermutlich aktive Teil des Sideromycins nicht direkt, sondern über einen wenig reaktiven aromatischen Ring mit dem Sideraminteil verbunden ist. Es wurde daher zwischen dem Sideramin und der antimikrobiellen Komponente ein Nicotinsäuremolekül eingebaut, um einen ausreichenden Abstand zwischen Vehikel und Hemmstoff zu erreichen. In dieser Substanzgruppe waren die Nalidixinsäure-Derivate unwirksam und nur die Sulfonamid-Sideramin-Derivate zeigten eine den natürlichen Sideraminen vergleichbare antibakterielle Aktivität gegen Staphylococcus aureus.

Nalidixinsäure ist ein Hemmstoff der DNA-Synthese (GOSS und COOK, 1975). Die Unwirksamkeit der Nalidixinsäure-Derivate könnte darin begründet sein, daß die Nalidixinsäure, die über ihre, für die antibakterielle Wirkung essentielle Carboxylgruppe an die Nicotinsäure gebunden ist, von den untersuchten Mikroorganismen nicht wieder freigesetzt werden kann. Für weitere Synthesen wäre eine labilere Verknüpfungsart empfehlenswert.

Gegen Escherichia coli war das Ferricrocin-Sulfonamid-Derivat I nicht aktiv, obwohl der Testorganismus ein Rezeptorprotein, das tonA-Genprodukt, für dieses Sideraminmolekül besitzt, auch wenn er diesen Eisenkomplexbildner selbst nicht synthetisieren kann. Da die an der Eisenaufnahme beteiligten Proteine unter Eisenmangel-

Bedingungen vermehrt synthetisiert werden (ROSENBERG und YOUNG, 1974; PUGSLEY und REEVES, 1976), wurde Escherichia coli unter entsprechenden Bedingungen kultiviert. Diese Kulturen waren empfindlich gegen das Derivat I. Die Frage, ob die Steigerung der Sensitivität auf eine vermehrte Synthese des tonA-Genproduktes zurückzuführen ist, oder ob gleichzeitig auch Enzyme zur Spaltung der reaktiven Komponente von dem Sideramin-Vehikel induziert werden - zum Beispiel die zur Aufnahme des Eisens aus den Enterochelin-Komplex notwendigen Esterasen - bleibt offen.

Die antimikrobielle Wirkung der Sulfonamid-Sideramin-Derivate gegen Staphylococcus aureus ließ sich im Kreuztest sowohl durch Ferrioxamin als auch durch Ferricrocin kompetitiv aufheben. Der gleiche kompetitive Antagonismus war bei Escherichia coli-Fe zwischen dem Derivat I und Ferricrocin zu beobachten. Die Aufhebungsmuster entsprachen denen mit natürlichen Sideromycinen und Sideraminen und ließen eine Konkurrenz der Stoffe um das gleiche Transportsystem annehmen. Diese Vermutung wurde durch die Beobachtung bestätigt, daß Spontanmutanten von Staphylococcus aureus, die gegen die natürlichen Sideromycine Albomycin und A 22765 resistent waren, Kreuzresistenz mit den semisynthetischen Sideromycinen aufwiesen. In Kreuztests mit dem spezifischen Antagonisten der Sulfonamide, p-Aminobenzoesäure, ließen sich die Sulfonamid-Sideramin-Derivate in ihrer Wirkung komplett aufheben. Da es sich hierbei um eine Konkurrenz auf der Ebene des Wirkortes handelt (BROWN, 1962; ANAND, 1975), beweist dieser Test, daß die Derivate in der Zelle als Sulfonamide wirksam sind. Das Bild der nichtkompetitiven Aufhebung ist sowohl von dem oben beschriebenen Antagonismus zwischen Sideraminen und Sideromycinen, als auch von dem Bild einer kompetitiven Aufhebung der Sulfanilamid-

Wirkung im Kreuztest durch p-Aminobenzoesäure verschieden, was eine zusätzliche Konkurrenz dieser Stoffe um ein gemeinsames Aufnahmesystem nicht ausschließen läßt.

Durch einen Vergleich der minimalen Hemmkonzentrationen konnte bei Staphylococcus aureus dür das Derivat I eine Wirkungssteigerung gegenüber der Ausgangssubstanz Sulfanilamid um einen Faktor 1000 bestimmt werden. Geeignete Hemmstoffe könnten also gegen Mikroorganismen, deren Sideramin-Transportsystem sie benutzen können, in 1000fach niedrigerer Dosierung eingesetzt werden. Vom pharmakologischen Standpunkt aus gesehen, bedeutet dieses eine erhebliche Herabsetzung der Toxizität von Hemmstoffen gegen die Wirtszelle und dadurch bedingte Nebenwirkungen auf den menschlichen Organismus.

Allgemeine Betrachtungen zum Vehikel-Konzept

Die Peptid-Transportsysteme haben bei den verschiedenen untersuchten Organismen wie Bakterien (BARAK und GILVARG, 1975 a), Hefen (NAIDER et al., 1974; LICHLITER et al., 1976), Pilzen (WOLFINBARGER und MARZLUFF, 1975 a,b), menschlichen (CRAMPTON, 1972; MATTHEWS, 1975; SLEISENGER et al., 1976) und pflanzlichen Zellen (HIGGINS und PAYNE, 1978 a,b) eine sehr unterschiedliche Spezifität in Bezug auf die Größe der transportierten Moleküle. Escherichia coli kann zum Beispiel nur Peptide transportieren, deren hydrodynamisches Volumen kleiner ist als das von Pentalysin (PAYNE und GILVARG, 1968). Als limitierender Faktor wird das Ausschlußvolumen der Poren der äußeren Membran angesehen (DECAD und NIKAIDO, 1976).

Für die Aufnahme großer Moleküle könnten weitere Untersuchungen der strukturellen und funktionellen Organi-

sation der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien spezifische Wege aufzeigen, über die Substrate mit einem Molekulargewicht von über 700 die Permeationsbarriere der äußeren Membran überwinden können. Analog zu dem gemeinsamen Rezeptorprotein für das Sideramin Ferricrocin und das Sideromycin Albomycin, könnten weitere Proteine, die bisher als Rezeptoren für Phagen und Colicine charakterisiert wurden, Bestandteile von Aufnahmesystemen sein, auf die sich das Vehikel-Konzept ausdehnen läßt.

Da bei den in dieser Arbeit untersuchten Transportsystemen hohe Resistenzraten auftreten, müssen Wege gefunden werden, eine schnelle Resistenzentwicklung zu umgehen. Eine Möglichkeit besteht in der Kopplung eines Hemmstoffes an verschiedene Vehikel. Hierfür käme neben den beschriebenen Transportsystemen eventuell noch das Transportsystem für Polyamine in Frage. ELLESTAD et al. (1978) beschrieben ein natürliches Antibiotikum, das an einen Spermidinrest geknüpft ist. Ein Transport dieses Antibiotikums über das Polyamin-Transportsystem konnte gezeigt werden (HÖLTJE, 1979 b).

Bei der Entwicklung weiterer Vehikel-transportierter Hemmstoffe sollten folgende Kriterien beachtet werden:

Die Verbindungen dürfen für menschliche Zellen nicht toxisch sein. Brauchbare Hemmstoffe sind demnach Antagonisten, die entweder selektiv in die Zellwandbiosynthese der Mikroorganismen eingreifen, oder solche, die die Biosynthese essentieller Aminosäuren oder Vitamine blockieren. Neben natürlichen Antibiotika könnten als Fortsetzung des Konzeptes von RINGROSE (1978) geeignete Vorstufen solcher Biosynthesewege, bei denen eine Carboxylfunktion durch eine Phosphonsäure ersetzt wurde, antagonistische Wirkung zeigen. Interessant wäre

zum Beispiel eine Derivatisierung der Vorstufe des Biotins, die Diaminopelargonsäure oder der Anthranilsäure, einer Vorstufe der Tryptophanbiosynthese.

Die Kopplung des Hemmstoffes an den Vehikel muß so gewählt werden, daß der Stoff in dem Mikroorganismus von seinem Transportteil freigesetzt werden kann.

Der Hemmstoff sollte in der freien Form nicht, oder nur schlecht in die Zellen transportiert werden. Unter solchen Bedingungen ist nach Freisetzung durch intrazelluläre Hydrolasen kein Carrier-vermittelter Efflux der Substanz zu erwarten. Dies würde zu einer erhöhten Akkumulation führen.

Ein wichtiger Faktor, der den aktiven Transport von Antibiotika beeinflußt, ist die zelluläre Regulation der Transportsysteme. Die Kontrollmechanismen für die Aufnahme Vehikel-transportierter Stoffe dürften denen der natürlichen Substrate entsprechen. So konnte für das Polyamin-Transportsystem, das durch Streptomycin induziert und für den Transport benutzt werden kann, gezeigt werden, daß es sowohl der stringenten Kontrolle als auch der Katabolit-Repression unterliegt (HÖLTJE, 1978, 1979 a). Die Aufnahme einer Anzahl anderer Antibiotika und toxischer Peptide scheint ebenfalls unter der positiven Kontrolle von cyclischem AMP zu stehen (ALPER und AMES, 1978). Die Vermutung, daß die Peptid-Transportsysteme der Katabolit-Repression unterliegen, konnte mit den in dieser Arbeit beschriebenen Peptid-Antibiotika bestätigt werden.

Als Modellsystem für das Konzept Vehikel-transportierter Hemmstoffe erwiesen sich das Oligopeptid-Transportsystem und das Sideramin-Transportsystem als geeignet. Beide Systeme zeigen nur eine geringe Substratspezifität und

sind unter den Mikroorganismen weit verbreitet. Die Vielzahl natürlicher Substrate zum Teil unterschiedlichster Strukturen für beide Transportsysteme erlauben Voraussagen über den Aufbau und die akzeptierte Größe eines an den entsprechenden Vehikel zu bindenden Hemmstoffes. Diese ersten Ergebnisse einer gezielten chemischen Kopplung von Hemmstoffen an Transportvehikel sollten ein Ansporn sein, nach weiteren Substraten aktiver Transportsysteme zu suchen, die sich als Vehikel für die Aufnahme von antimikrobiellen Substanzen eignen.

5. Z U S A M M E N F A S S U N G

In der vorliegenden Arbeit wurden als Modellsysteme für das Konzept Vehikel-transportierter Hemmstoffe das Oligopeptid-Transportsystem und das Sideramin-Transportsystem untersucht.

Zunächst konnte die Aufnahme der Peptid-Antibiotika L-Phosphinothricyl-alanyl-alanin, L-(N^5-Phosphono) methionin-S-sulfoximinyl-alanyl-alanin und Plumbemycin B über das OPT-System von Escherichia coli durch Antagonismustests mit verschiedenen Peptiden und die Kreuzresistenz zwischen den Antibiotika und $(Orn)_3$ bewiesen werden.

Die Verbreitung von Peptid-Transportsystemen bei verschiedenen Mikroorganismen wurden untersucht.

In einem ersten Beispiel für einen Vehikel-vermittelten Transport einer synthetischen Verbindung wurde nachgewiesen, daß das synthetische Methioninsulfon, das über ein Methionin-Transportsystem aufgenommen wird, nach Kopplung an einen Alanyl-alanin-Rest über das OPT-System in die Zelle transportiert wird. Auf diese Weise war es möglich, eine toxische Substanz über zwei unabhängige Transportwege in die Zelle zu schleusen.

Es wurde geprüft, inwieweit Sideramine als Vehikel für Sulfanilamid und Nalidixinsäure benutzt werden können. Hierbei konnte gezeigt werden, daß Sulfonamid-Sideramin-Derivate Transportsysteme für Sideramine benutzen können und im Zellinnern als Sulfonamide wirksam sind.

Für das semisynthetische Sideromycin 6-Sulfanilamido-nicotinsäure-ferricrocinylester konnte eine Wirkungssteigerung gegenüber der Ausgangssubstanz Sulfanilamid um einen Faktor 1000 ermittelt werden.

Möglichkeiten für einen praktischen Einsatz Vehikel-transportierter Hemmstoffe werden diskutiert.

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

ADLER, S.P., D. PURICH and E.R. STADTMAN: Cascade control of Escherichia coli glutamine synthese. J.Biol.Chem. 250, 6264 - 6272 (1975)

ALLEN, J.G., F.R. ATHERTON, M.J. HALL, C.H. HASSALL, S.W. HOLMES, R.W. LAMBERT, L.J. NISBETH and P.S. RINGROSE: Phosphonopeptides, a new class of synthetic antibacterial agents. Nature 272, 56-58 (1978)

ALLEN, J.G., D.A. GILBERT, G.S. HARRIS, L. HAVAS, S.W. HOLMES, M.R. JACKSON, I. LENOX-SMITH and M.W. PARKES: 10th int. Congress Chemo.Abstr.no. 366 (1977)

ALPER, M.D. and B.N. AMES: Transport of antibiotics and metabolite analogs by systems under cyclic AMP controll: Positive selection of Salmonella typhimurium cya and crp mutants. J.Bacteriol. 133, 149-157 (1978)

AMES, B.N., G.F. AMES, J.D. YOUNG, D. ISUCHIDA and J. LECOQ: Illicit transport, the oligopeptide permease. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 70, 456-458 (1973)

AMES, G.G. and J.R. ROTH: Histidine and aromatic permeases of Salmonella typhimurium. J.Bacteriol. 96, 1742-1749 (1968)

ANAND, N.: Sulfonamides and sulfones. In: Antibiotics, Vol. III, pp. 668-698; eds.: J.W. Corcoran and F.E. Hahn. Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag 1975

BARAK, Z. and C. GILVARG: Triornithine - resistant strains of Escherichia coli. Isolation, definition and genetic studies. J.Biol.Chem. 249, 143-148 (1974)

BARAK, Z. and C. GILVARG: Peptide transport. In: Biomembranes, Vol. 7, pp. 167-218; eds.: H. Eisenberg, E. Katchalski-Katzir, and L.A. Manson. New York: Plenum 1975 a

BARAK, Z. and C. GILVARG: Specialized peptide transport system in Escherichia coli. J.Bacteriol. 122, 1200-1207 (1975 b)

BAYER, E., K.H. GUGEL, K. HÄGELE, H. HAGENMAIER, S. JESSIPOW, W.A. KÖNIG and H. ZÄHNER: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 98. Mitteilung. Phosphinothricin und Phosphinothricyl-alanyl-alanin. Helv.Chim.Acta 55, 224-239 (1972)

BECKER, J.M. and F. NAIDER: Peptide transport in yeast: Uptake of radioactive trimethionine in Saccharomyces cerevisiae. Arch.Biochem.Biophys. 178, 245-255 (1977)

BERDY, J.: Recent developments of antibiotic research and classification of antibiotics according to the chemical structure. Advan.Appl.Microbiol. 18, 309-406 (1974)

BEUTEL, J.A., W.J. MOLLER, W.O. REIL, L.B. FITCH and D.H. CHANEY: Fireblight - evaluation of chemical treatment on pear. Calif.Agric. 27, 3-4 (1973)

BICKEL, H., E. GÄUMANN, W. KELLER-SCHIERLEIN, V. PRELOG, E. VISCHER, A. WETTSTEIN und H. ZÄHNER: Über eisenhaltige Wachstumsfaktoren, die Sideramine, und ihre Antagonisten, die eisenhaltigen Antibiotika Sideromycine. Experientia 16, 128-133 (1960)

BRAUN, V.: Membranpermeation und Antibiotika-Resistenz bei Bakterien. Naturwissenschaften 64, 126-132 (1977)

BRAUN, V.: Structure-function relationships of the gram-negative bacterial cell envelope. Symp.Soc. Gen.Microbiol., 28, 111-138 (1978)

BRAUN, V., R.E.W. HANCOCK, K. HANTKE and A. HARTMANN: Functional organization of the outer membrane of Escherichia coli: Phage and colicin receptors as components of iron uptake systems. J.Supramolec. Struct. 5, 37-58 (1976)

BRENNENSTUHL, M.: Bedeutung des PEP: Zucker Phosphotransferasesystems für die Akkumulation von Streptozotozin durch Escherichia coli und Staphylococcus aureus. Diplomarbeit Universität Tübingen (1976)

BROWN, G.M.: The biosynthesis of folic acid. II. Inhibition by sulfonamides. J.Biol.Chem. 237, 536-540 (1962)

BYERS, B.R.: Iron transport in gram-positive and acid-fast bacilli. In: Microbial Iron Metabolism, pp. 83-105; ed.: J.B. Neilands. New York-London: Academic Press 1974

CASCIERI, T.jr. and M.F. MALETTE: Peptide utilization by Pseudomonas putida and Pseudomonas maltophilia. J. Gen. Microbiol. 92, 283-295 (1976)

CRAMPTON, R.F.: Nutritional and metabolic aspects of peptide transport. In: Peptide Transport in Bacteria and Mammalian Gut, pp. 1-7; CIBA Foundation Symposium. Amsterdam-London-New York: Elsevier 1972

DÄHN, U., H. HAGENMAIER, H. HÖHNE, W.A. KÖNIG, G. WOLF und H. ZÄHNER: Stoffwechselprodukte von Microorganismen. 154. Mitteilung. Nikkomycin, ein neuer Hemmstoff der Chitinsnsthese bei Pilzen. Arch. Microbiol. 107, 143-160 (1976)

DAVIS, B.P. and E.S. MINGIOLI: Mutants of Escherichia coli requiring methionine or vitamine B_{12}. J. Bacteriol. 60, 17-28 (1950)

DE FELICE, M.J., J. GUARDIOLA, A. LAMBERTI and M. IACCARINO: Escherichia coli K-12 mutants altered in the transport systems for oligo- and dipeptides. J.Bacteriol. 116, 751-756 (1973)

DECAD, G.M. and H. NIKAIDO: Outer membrane of gram-negative bacteria. XII. Molecular-sieving function of cell wall. J.Bacteriol. 128, 325-336 (1976)

DENGLER, D.: Untersuchung zur Wirkungsweise des Sideromycins A 22765. Dissertation Universität Tübingen (1979)

DIDDENS, H., H. ZÄHNER, E. KRAAS, W. GÖHRING and G. JUNG: On the transport of tripetide antibiotics in bacteria. Eur.J.Biochem. 66, 11-23 (1976)

DIDDENS, H., M. DORGERLOH and H. ZÄHNER: Metabolic products of microorganisms 176. On the transport of small peptide antibiotics in bacteria. J.Antibiotics 32, 87-90 (1979)

ELLESTAD, G.A., D.B. COSULICH, R.W. BROSCHARD, J.H. MARTIN, M.P. KUNSTMANN, G.O. MORTON, J.E. LANCASTER, W. FULMOR and F.M. LOVELL: Glycocinnamoylspermidines, a new class of antibiotics.3. The structures of LL-BM 123β,γ_1 and γ_2. J.Am.Chem.Soc. 100, 2515-2524 (1978)

EMERY, T.: Hydroxamic acids of natural origin. Adv. Enzymol. 35, 135-185 (1971)

ENDO, A., K. KAKIKI and T. MISATO: Mechanism of action of the antifungal agent polyoxin D. J.Bacteriol. 104, 189-196 (1970)

FICKEL, T.E. and C. GILVARG: Transport of impermeant substances in Escherichia coli by way of oligopeptide permease. Nature 241, 161-163 (1973)

FIEDLER, E.: Über zwei homologe Peptidantibiotika, Substanz A (MSD-235 S_2) und Substanz B (MSD-235 S_3) aus Streptomyces griseoviridis. Dissertation Universität Tübingen (1976)

FRANKLIN, T.J.: Resistance of Escherichia coli to tetracyclines: changes in permeability in Escherichia coli bearing resistance factors. Biochem.J. 105, 371-378 (1967)

FRANKLIN, T.J.: Antibiotic transport in bacteria. CRC Crit.Rev.Microbiol. 30, 253-272 (1973)

FRANKLIN, T.J.: Factors affecting the penetration of antibiotics into bacteria. In: Industrial Aspects of Biochemistry, Vol.30, part II, pp. 549-575; ed.: B.Spencer. Amsterdam: North Holland Publ. Comp. 1974

GILVARG, C.: Peptide transport in bacteria. In: Peptide Transport in Bacteria and Mammalian Gut, pp. 11-16; CIBA Foundation Symposium. Amsterdam-London-New York: Associated Scientific Publishers 1972

GILVARG, C. and Y. LEVIN: Response of Escherichia coli to ornithyl peptides. J.Biol.Chem. 247, 543-549 (1972)

GOSS, W.A. and T.M. COOK: Nalidixic acid - mode of action. In: Antibiotics, Vol.III, pp. 174-196; eds.: J.W. Corcoran and F.E. Hahn. Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag 1975

GUGEL, K.H.: Isolierung und Wirkungsweise von Phosphinotricyl-alanyl-alanin, ein Antibiotikum aus Streptomyces viridochromogenes. Dissertation Universität Tübingen (1971)

HANTKE, K. and V. BRAUN: Membrane receptor dependent iron transport in Escherichia coli. FEBS Lett. 49, 301-305 (1975 a)

HANTKE, K. and V. BRAUN: A function common to iron-enterochelin transport and action of colicin B,I,V in Escherichia coli. FEBS Lett. 59, 277-281 (1975 b)

HANTKE; K. and V. BRAUN: Functional interaction of the tonA / tonB receptor system in Escherichia coli. J.Bacteriol. 135, 190-197 (1978)

HIGGINS, C.F. and J.W. PAYNE: Peptide transport by germinating barley embryos: Uptake of physiological di- and oligopeptides. Planta 183, 211-215 (1978 a)

HIGGINS, C.F. and J.W. PAYNE: Peptide transport by germinating barley embryos: Evidence for a single common carrier for di- and oligopeptides. Planta 183, 217-221 (1978 b)

HÖHNE, H.: Nikkomycin, ein neuer Hemmstoff der mikrobiellen Chitinsynthese. Dissertation Universität Tübingen (1974)

HÖLTJE, J.V.: Streptomycin uptake via an inducible polyamine transport system in Escherichia coli. Eur.J.Biochem. 86, 345-351 (1978)

HÖLTJE, J.V.: Regulation of polyamine and streptomycin transport during stringent and relaxed control in Escherichia coli. J.Bacteriol. 137, 661-663 (1979 a)

HÖLTJE, J.V.: Persönliche Mitteilung. 1979 b

HORI, M., K. KAKIKI and T. MISATO: Further study on the relation of polyoxin structure to chitin synthetase inhibition. Agr.Biol.Chem. 38, 691-698 (1974 a)

HORI, M., K.KAKIKI and T. MISATO: Interaction between polyoxin and active center of chitin synthetase. Agr.Biol.Chem. 38, 699-705 (1974 b)

HUHTANEN, D.P. and R.H. CONVERSE: Temporary remission of strawberry june yellows and witches' broom by use of oxytetracyclin. Phytopath. 61, 1137-1139 (1971)

IGWEBE, E.C. and E.C. CALAVAN: Effect of tetracycline antibiotics on symptom development of stubborn desease and infections variegation of citrus seedlings. Phytopath. 63, 1044-1048 (1973)

JORDAN, D.C. and P.E. REYNOLDS: Vancomycin. In: Antibiotics, Vol.I, pp. 102-116; eds.: D. Gottlieb and P.D. Shaw. Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag 1967

KADNER, R.J.: Regulation of methionine transport activity in Escherichia coli. J.Bacteriol. 122, 110-119 (1975)

KADNER, R.J.: Transport and utilization of D-methionine and other methionine sources in Escherichia coli. J. Bacteriol. 129, 207-216 (1977)

KAHAN, F.M., J.S. KAHAN, P.J.CASSIDY and H. KROPP: The mechanism of action of fosfomycin (phosphonomycin). Ann.N.Y.Acad.Sci. 235, 364-386 (1974)

KENIG, M. and E.P. ABRAHAM: Antimicrobial activities and antagonists of bacilysin and anticapsin. Gen. Microbiol. 94, 37-45 (1976)

KENIG, M., E. VANDAMME and E.P. ABRAHAM: The mode of action of bacilysin and anticapsin and biochemical properties of bacilysin-resistant mutants. J.Microbiol. 94, 46-54 (1976)

KNÖSEL; D.: Zur Bekämpfung von Xanthomonas begoniae (Takimoto) Dawson durch Blattspritzungen mit Antibiotika und anderen Präparaten. Nachrichtenblatt des deutschen Pflanzenschutzdienstes 21, 727-728 (1969)

KNÜSEL, F. and W. ZIMMERMANN: Sideromycins. In: Antibiotics. Vol.III, pp. 653-667; eds. J.W. Corcoran and F.E. Hahn. Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag 1975

KOLLONITSCH, J., L. BARASCH, F.M. KAHAN and H. KROPP: New antibacterial agent via photofluorination of a bacterial cell wall constituent. Nature 243, 346-347 (1973)

KOMATSU, Y. and K. TANAKA: A showdomycin resistant mutant of Escherichia coli K-12 with altered nucleoside transport character. Biochem. Biophys.Acta 288, 390-403 (1972)

KONDO, Y., T. SHOMURA, Y. OGAWA, T. TSURUOKA, H. WATANABE, K. TOTSUKAWA, T. SUZUKI, C. MORIYAMA, J. YOSHIDA, S. INOUYE and T. NIIDA: Studies on a new antibiotic SF-1293. I. Isolation and physicochemical and biological characterization of SF-1293 substance. Sci.Rep. Meiji Seika Kaisha 13, 34-41 (1973)

KRAAS, E.: Synthesen von Aminosäuren mit Purinyl- und 8-Azapurinylseitenketten. Dissertation Universität Tübingen (1975)

LANGE, S.: Untersuchungen zur Bekämpfung bakterieller Erreger von Pflanzenkrankheiten mit Antibiotika. Dissertation Universität Tübingen (1975)

LEVY, S.B. and L. McMURRAY: Detection of an inducible membrane protein associated with R-factor-mediated tetracycline resistance. Biochem.Biophys.Res. Commun. 56, 1060-1068 (1974)

LICHLITER, W.D., F.NAIDER and J.M. BECKER: Basis for the design of anticandidal agents from studies of peptide utilization in Candida albicans. Antimicrob.Agents Chemother. 10, 483-490 (1976)

MAEHR, H. and R.G. PITCHER: Identity of albomycin δ_2 and antibiotic Ro 5-2667. J.Antibiotics 24, 830-834 (1971)

MARDER, R.J., J.M. BECKER and F. NAIDER: Peptide transport in yeast: Utilization of leucine- and lysine-containing peptides by Saccharomyces cerevisiae. J.Bacteriol. 131, 906-916 (1977)

MATTHEWS, D.M.: Absorption of peptides by mammalian intestine. In: Peptide Transport in Protein Nutrition, pp. 61-146; eds.: D.M. Matthews and J.W. Payne. Amsterdam: North Holland Publishing Company 1975

MATTHEWS, D.M. and J.W. PAYNE: Peptides in the nutrition of microorganisms and peptides in relation to animal nutrition. In: Peptide Transport in Protein Nutrition, pp. 1-60; eds.: D.M. Matthews and J.W. Payne. Amsterdam: North Holland Publishing Company 1975 a

MATTHEWS, D.M. and J.W. PAYNE: Occurence and biological activity of peptides. In: Peptide Transport in Protein Nutrition, pp. 392-463; eds. D.M. Matthews and J.W. Payne. Amsterdam: North Holland Publishing Company 1975 b

MITANI, M. and Y. INOUE: Antagonists of antifungal substance polyoxin. J.Antibiotics 21, 492-496 (1968)

MOLLOY, B.B., D.H. LIVELY, R.M. GALE, M. GORMAN, L.D. BOECK, C.E. HIGGENS, R.E. KASTNER, L.L. HUCKSTEP and N. NEUSS: A new dipeptide antibiotic from Streptomyces collinus, Lindenbein. J.Antibiotics 25, 137-140 (1972)

NAEGELI, H.-U.: Synthetische Modelle für den Antagonismus zwischen Sideromycinen und Sideraminen. Dissertation 6232 ETH Zürich (1978)

NAIDER, F. and J.M. BECKER: Multiplicity of oligopeptide transport systems in Escherichia coli. J.Bacteriol. 122, 1208-1215 (1975)

NAIDER, F., J.M. BECKER and E. KATZIR-KATCHALSKI: Utilization of methionine-containing peptides and their derivatives by a methionine-requiring auxotrophe of Saccharomyces cerevisiae. J.Biol.Chem. 249, 9-20 (1974)

NAKAE, T.: Outer membrane of Salmonella. Isolation of protein complex that produces transmembrane channels. J.Biol.Chem. 251, 2176-2178 (1976)

NAKAE, T. and H. NIKAIDO: Outer membrane as a diffusion barrier in Samonella typhimurium. Penetration of oligo- and polysaccharides into isolated outer membrane vesicles and cells with degraded peptidoglycan layer. J.Biol.Chem. 250, 7359-7365 (1975)

NEILANDS, J.B.: Microbial Iron Metabolism. New York-London: Academic Press 1974

NIKAIDO, H., S.A. SONG, L. SHALTIEL and M. NURMINEN: Outer membrane of Salmonella. XIV Reduced transmembrane diffusion rates in porin-deficient mutants. Biochem.Biophys.Res.Commun. 76, 324-330 (1977)

NÜESCH, J. and F. KNÜSEL: Sideromycins. In: Antibiotics, Vol.I, pp. 499-541; eds.: D. Gottlieb and P.D. Shaw. Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag 1967

PARK, G.K., A. HIROTA and H. SAKAI: Studies on new antimetabolite N-1409. Agric.Biol.Chem. 41, 161-167 (1977 a)

PARK, G.K., A. HIROTA and H. SAKAI: Structure of plumbemycin A and B, antagonists of L-threonine from Streptomyces plumbeus. Agric.Biol.Chem. 41, 573-579 (1977 b)

PATTERSON, E.L., B.L. JOHNSON, S.E. DE VOE and N. BOHONOS: Structure of the antitumor antibiotic alazopeptin. Antimicrob.Agents Chemother. 1965, 115-118 (1966)

PAYNE, J.W.: Oligopeptide transport in Escherichia coli: Specificity with respect to side chain and distinction from dipeptide transport. J.Biol.Chem. 243, 3395-3403 (1968)

PAYNE, J.W.: Mechanisms of bacterial peptide transport. In: Peptide Transport in Bacteria and Mammalian Gut, pp. 17-31; CIBA Foundation Symposium. Amsterdam-London-New York: Associated Scientific Publishers (1972)

PAYNE, J.W.: Peptide transport in Escherichia coli: Permease specificity towards terminal amino group substituents. J.Gen.Microbiol. 80, 264-276 (1974)

PAYNE, J.W.: Transport of peptides in microorganisms. In: Peptide Transport in Protein Nutrition, pp.283-364; eds.: D.M. Matthews and J.W. Payne. Amsterdam: North Holland Publishing Company 1975

PAYNE, J.W.: Peptides and microorganisms. Adv.Microbiol. Physiol. 13, 55-113 (1976)

PAYNE, J.W. and G. BELL: Direct determination of the properties of peptide transport systems in Escherichia coli, using a fluorescent-labeling procedure. J.Bacteriol. 137, 447-455 (1979)

PAYNE, J.W. and C. GILVARG: Size restriction on peptide utilization in Escherichia coli. J.Biol.Chem. 243, 6291-6299 (1968)

PAYNE, J.W. and C. GILVARG: Peptide transport. Adv. Enzymol. 35, 187-244 (1971)

PAYNE, J.W. and C. GILVARG: Transport of peptides in bacteria. In: Bacterial Transport, pp.325-384; eds.: B.P. Rosen. New York-Basel: Marcel Dekker 1978

PINNOCK, C., B. SHANE and E.L.R. STOKSTAD: Stimulatory effects of peptides on growth of the free-living mematode Caenorhabditis briggsae (B 8615). Proc. Soc.Exp.Biol.Med. 148, 710-713 (1975)

PLAKUNOV, V.K.: Relation between chemical structure of tetracyclines and their analogues and specific features of transport and mechanism of antibacterial effect. Antibiotiki 18, 1069-1073 (1973)

PORALLA,K.: Zur Wirkungsweise des makrolidartigen Antibiotikums Barrelidin und typischer Makrolid-antibiotika. Dissertation Universität Tübingen (1967)

PRUESS, D.L., J.P. SCANNELL, H.A. AX, M. KELLETT, F. WEISS, T.C. DEMNY and A. STEMPEL: Antimetabolites produced by microorganisms. L(N^5-Phosphono) methionine-S-sulfoximinyl-L-alanyl-L-alanine. J.Antibiotics 26, 261-266 (1973)

PUGSLEY,A.P. and P. REEVES: Increased production of the outer membrane receptors for colicins B, D and M by Escherichia coli under iron starvation. Biochem.Biophys.Res.Commun. 70, 846-853 (1976)

RINGROSE, P.S.: Peptides as antimicrobial agents. In: Transport and Utilization of Amino Acids, Peptides and Proteins by Microorganisms; ed. Payne, J.W., im Druck. 1978

RONZIO, R.A., W.B. ROWE and A. MEISTER: Studies on the mechanism of inhibition of glutamine synthetase by methionine sulfoximine. Biochemistry 8, 1066-1075 (1969)

ROSENBERG, H. and I.G. YOUNG: Iron transport in the enteric bacteria. In: Microbial Iron Metabolism, pp. 67-82; ed.: J.B. Neilands. New York-London: Academic Press 1974

RUBINO, A., FIELD, M. and H. SCHWACHMAN: Intestinal transport of amino acid residues of dipeptides: Influx of the glycine residue of glycyl-L-proline across mucosal border. J.Biol.Chem. 246, 3542-3548 (1971)

SCHINDLER, P.: Unveröffentliche Daten 1976

SCHMIDLE, A.: Vortrag im Institut für Mikrobiologie. Universität Tübingen 1977

SHAPIRO, B.M. and E.R. STADTMAN: The regulation of glutamine synthesis in microorganisms. Ann.Rev. Microbiol. 24, 501-524 (1970)

SLEISENGER, M.H., D. BURSTON, J.A. DALRYMPLE, S. WILKINSON and D.M. MATTHEWS: Evidence for a single common carrier for uptake of a dipeptide and a tripeptide by hamster jejenum in vitro. Gastroenterology 71, 76-81 (1976)

SNOW, G.A.: Mycobactins: Iron chelating growth factors from Mycobacteria. Bacteriol.Rev. 34, 99-125 (1970)

SRIPRAKASH, K.S. and T. RAMAKRISHNAN: Isoniazid-resistent mutants of Mycobacterium tuberculosis H37RV: Uptake of isoniazid and the properties of NADase inhibitor. J.Gen.Microbiol. 60, 125-132 (1970)

STAPP, C.: Pflanzenpathogene Bakterien. Berlin-Hamburg: Paul Parey 1958

SUHADOLNIK, R.J.: Nucleoside Antibiotics. New York-London-Sydney-Toronto: Wiley-Interscience 1970

TURKOVA, J., O. MIKES and F. SORM: Chemical composition of the antibiotic albomycin. VIII. The Determination of the sulfur atom bond in the molecule of the antibiotic albomycin. Coll.Czech.Chem.Comm. 30, 118-127 (1965)

UMEZAWA, H.: Bleomycin. In: Antibiotics, Vol.III, pp. 21-33; eds.: J.W. Corcoran and F.E. Hahn. Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag 1975

VAZQUEZ, D.: Antibiotics which affect protein synthesis: The uptake of (^{14}C) chloramphenicol. Biochem.Biophys.Res.Commun. 12, 409-414 (1963)

VAZQUEZ, D.: Uptake and binding of chloramphenicol by sensitive and resistant organisms. Nature 203, 257-258 (1964)

WARGEL, R.J., C.A. SHADUR and F.C. NEUHAUS: Mechanisms of D-cycloserine action: Transport systems for D-alanine, D-cycloserine, L-alanine and glycine. J.Bacteriol. 103, 778-788 (1970)

WARGEL, R.J., G.A. SHADUR and F.C. NEUHAUS: Mechanism of D-cycloserine action: Transport mutants for D-alanine, D-cycloserine and glycine. J.Bacteriol. 105, 1028-1035 (1971)

WINDSOR, J.M. and L.M. BLACK: Remisssion of symptoms of clover club leaf following treatment with penicillin Phytopath. 63, 44-46 (1972)

WOLFINBARGER, J.R. and G.A. MARZLUF: Peptide utilization by amino acid auxothrophs of Neurospora crassa. J.Bacteriol. 119, 371-378 (1974)

WOLFINBARGER, J.R., L., and G.A. MARZLUFF: Size restriction on utilization of peptides by amino acid auxothrophs of Neurospora crassa. J.Bacteriol. 122, 949-956 (1975 a)

WOLFINBARGER, J.R., L., and G.A. MARZLUFF: Specificity and regulation of peptide transport in Neurospora crassa. Arch.Biochem.Biophys. 171, 637-644 (1975 b)

WOOLEY, D.W.: A Study of Antimetabolites. New York: Wiley and Sons 1952

WOOLFOLK, C.A. and E.R. STADTMAN: Regulation of glutamine synthetase. III. Cumulative feedback inhibition of glutamine synthetase from Escherichia coli. Arch.Biochem.Biophys. 118, 736-755 (1967)

WU, H.C. and P.S. VENKATESWARAN: Fosfomycin-resistant mutant of Escherichia coli. Ann.N.Y.Acad.Sci. 235, 587-592 (1974)

ZÄHNER, H.: Biologie der Antibiotica. Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag 1965

ZÄHNER, H.: Einige Aspekte der Antibiotica-Forschung. Angew.Chem. 89, 696-703 (1977)

ZÄHNER, H. and W.K. MAAS: Biology of antibiotics. New York-Heidelberg-Berlin: Springer-Verlag 1972

ZÄHNER, H., E. BACHMANN, R. HÜTTER und J. NÜESCH: Sideramine, eisenhaltige Wachstumsfaktoren aus Mikroorganismen. Path.Mikrobiol. 25, 708-736 (1962)

ZÄHNER, H., H. DIDDENS, W. KELLER-SCHIERLEIN and H.U. NAEGELI: Some experiments with semisynthetic sidermycins. J.Antibiotics Suppl. 30, S-201-S-206 (1977)

ZÄHNER, H., R. HÜTTER und E. BACHMANN: Stoffwechselprodukte von Actinomyceten. 23. Mitteilung. Zur Kenntnis der Sideromycinwirkung. Arch.Mikrobiol. 36, 325-349 (1960)

ZIMMERMANN, W.: Sideromycin-Resistenz und Sideromycin-Sideramin Antagonismus bei Staphylococcus aureus. Dissertation Universität Zürich (1970)

ZIMMERMANN, W. and F. KNÜSEL: Permeability of Staphylococcus aureus to the sideromycin antibiotic A 22765. Arch.Microbiol. 68, 107-112 (1969)

Lebenslauf

15. 12. 1949	geboren in Bunderhammrich
1956 - 1960	Volksschule Bunderhammrich
1960 - 1968	Teletta-Gross-Schule, Leer/Ostfr.
18. 6. 1968	Reifeprüfung an der Teletta-Gross-Schule, Leer/Ostfr.
ab WS 1968/69	Biologiestudium an der Universität Tübingen
14. 4. 1971	Diplomvorprüfung in Biologie
14. 3. 1975	Diplomprüfung in Biologie anschließend Anfertigung der Dissertation: "Untersuchungen zum Transport von Antibiotika über die Aufnahmesysteme für Oligopeptide und Sideramine" am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I der Universität Tübingen unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. H. Zähner.

Meine akademischen Lehrer waren:

V. Braun, U. Feine, K.G. Grell, J. Guglielmi, W. Haberlandt, V. Hemleben, O. Kallee, H. Krüger, W. Löffler, K. Mägdefrau, H. Metzner, G.F. Meyer, G. Mickoleit, F.P. Möhres, K. Mörike, E. Müller, H. Pape, K. Pelling, A. Rieker, H. Ritter, W. Rüdorff, E.M. Sander, J. Schmitt, U. Schwarz, W. Schweizer, B. Schwemmle, H. Seiler, W. Seyffert, D. Varjú, G. Weizel, U. Weser, K. Wöhrmann, H. Zähner, K. Zetsche.